Aus dem Pharmakologischen Institut
der Freien Universität Berlin
Direktor: Prof. Dr. med. Hans Herken

Einfluß von Praseodym auf Reaktionen des Kohlenhydratstoffwechsels

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Randolf Schurig
aus Arnsdorf/Sa.

1974

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546512_0036

Aus dem Pharmakologischen Institut
der Freien Universität Berlin
Direktor: Prof. Dr. med. Hans Herken

Einfluß von Praseodym auf Reaktionen des Kohlenhydratstoffwechsels

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Randolf Schurig
aus Arnsdorf/Sa.

Referent: Prof. Dr. med. E. Oberdisse

Korreferent: Prof. Dr. Risse

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fachbereiche der Freien Universität Berlin

Promoviert am 2. Juli 1974

Inhaltsverzeichnis

	Seite
A Einleitung	1
B Methoden	
I Tiermaterial, Reagenzien, Vorbehandlung	4
II Enzymaktivitätsbestimmungen	
1. Pyruvat-Carboxylase	5
2. Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase	8
3. Glucose-6-phosphatase	12
4. Fructose-1,6-diphosphatase, ph-Fructokinase Fruc-1,6-diph-aldolase, Glyceraldehydph-DH, Glycerinph-DH, Pyruvatkinase, Lactat-DH, Glucose-6-ph-DH und 6-ph-Gluconat-DH	12
5. Berechnung der Enzymaktivitäten	16
III Glucoseproduktion in Schnitten	17
IV Glucosebestimmung	19
V Proteinbestimmung	19
VI Statistische Berechnungen	19
C Ergebnisse	
I Glucosekonzentration im Blut	21
II Glucoseproduktion von Leberschnitten	21
III Enzymaktivitätsbestimmungen	
1. Pyruvat-Carboxylase	25
2. Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase	25
3. Glucose-6-phosphatase	34
4. Fructose-1,6-diphosphatase	36
5. Fruc-1,6-diph-Ald, Glyceraldehyph-DH, Lactat-DH und Glycerinphosphat-DH	36
6. Pyruvatkinase	39
7. ph-Fructokinase	41
8. Glucose-6-ph-DH und 6-ph-Gluconat-DH	43

Seite

IV Einfluß von Praseodym auf die durch Hunger induzierte Gluconeogenese 47

D Diskussion 50

E Zusammenfassung 63

F Literaturverzeichnis 65

Abkürzungsverzeichnis

ADP	Adenosindiphosphat	
ATP	Adenosintriphosphat	
CoA-SH	Coenzym A	
-DH	-Dehydrogenase	
DNA	Desoxyribonukleinsäure	
EDTA	Äthylendinitrilotetraessigsäure -Dinatriumsalz	
Fruc-6-ph	Fructose-6-phosphat	
Fruc-1,6-diph	Fructose-1,6-diphosphat	
Fruc-1,6-diphase	Fructose-1,6-diphosphatase	E.C. 3.1.3.11
Fruc-1,6-diph-ald	Fructose-1,6-diphosphat-aldolase	E.C. 4.1.2.7
GAP-DH	Glycerinaldehydphosphat-Dehydrogenase	E.C. 1.2.1.12
Gluc-1-ph	Glucose-1-phosphat	
Gluc-6-ph	Glucose-6-phosphat	
Gluc-6-phase	Glucose-6-phosphatase	E.C. 3.1.3.9
Gluc-6-ph-DH	Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase	E.C. 1.1.1.49
GlDH	Glutamat-Dehydrogenase	E.C. 1.4.1.3
GP-DH	Glycerinphosphat-Dehydrogenase	E.C. 1.1.1.8
α-HCH	α-Hexachlorcyclohexan	
LDH	Lactat-Dehydrogenase	E.C. 1.1.1.27
MDH	Malat-Dehydrogenase	E.C. 1.1.1.37
NAD	Nicotinamid-adenin-dinukleotid, oxydiert	
NADH	Nicotinamid-adenin-dinukleotid, reduziert	
NADP	Nicotinamid-adenin-dinukleotid-phosphat, oxydiert	
NADPH	Nicotinamid-adenin-dinukleotid-phosphat, reduziert	
P-C	Pyruvat-Carboxylase	E.C. 6.4.1.1
PEP-CK	Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase	E.C. 4.1.1.32
P-K	Pyruvat-Kinase	E.C. 2.7.1.40
ph	anorg. Phosphat HPO_4^{--}	
-ph/ph-	org. gebundener Phosphatrest $R\text{-}HPO_3$	

ph-Fruc-kin	Fructose-6-phosphat-Kinase	E.C. 2.7.1.11
6-ph-Glucon	Gluconat-6-phosphat	
6-ph-Glucon-DH	Gluconat-6-phosphat-Dehydrogenase	E.C. 1.1.1.44
RNA	Ribonukleinsäure	
TCA	Trichloressigsäure	
TIM	Trioseisomerase	E.C. 5.3.1.1
Tris-HCl	Tris(hydroxymethyl)-amino-methan-Hydrochlorid	
TTP	Thymidintriphsophat	

A Einleitung

Untersuchungen über biologische Wirkungen der Seltenen Erdmetalle gehen bis in das vergangene Jahrhundert zurück. In dem Handbuch der Experimentellen Pharmakologie von HEFFTER und HEUBNER befinden sich in dem Beitrag von STEIDLE (1935) über "Seltene Erdmetalle" bereits mehr als 400 Literaturzitate. Besonderes Interesse erlangten die Salze der Lanthaniden für die Toxikologie, als in den 30er Jahren ihre bevorzugte Wirkung auf den Leberstoffwechsel und die Blutglucosekonzentration entdeckt wurde (MAXWELL und BISCHOFF 1931, FISCHLER und ROECKL 1938). Nach intravenöser Injektion kleiner Dosen kommt es zu einer diffusen Verfettung der Leber mit Nekrosen der Epithelzellen sowie leukozytären und histiozytären Infiltrationen. Gleichzeitig entsteht eine ausgeprägte und über mehrere Tage anhaltende Hypoglykämie. Auch an der Milz wurden vereinzelt Nekrosen und Wucherungen von Makrophagen beobachtet (VINCKE und OELKERS 1938). An anderen Organen konnten bis jetzt keine pathologischen Veränderungen festgestellt werden.

Alle Wirkungen können nur nach Applikation der ersten vier Elemente der Lanthaniden (La, Ce, Pr, Nd) ausgelöst werden, während die Seltenen Erden mit höherer Atomzahl (63 bis 71) eine wesentlich geringere Toxizität besitzen und keine Fetteinlagerung in der Leber verursachen (KYKER und CRESS 1957, SNYDER et al. 1959).

Bisher wurden die Seltenen Erdmetalle lediglich zu Untersuchungen über die experimentelle Leberverfettung benutzt. Während zum Pathomechanismus der Fetteinlagerung bereits eine größere Anzahl von Publikationen erschienen ist (z.B. KYKER und CRESS 1957, SNYDER et al. 1959, NEUBERT und HOFFMEISTER 1960, LOMBARDI und RECKNAGEL 1962, MAGNUSSON 1963), liegen unseres Wissens bis heute keine Befunde über den eigentlichen Entstehungsmechanismus der Hypoglykämie vor.

Von BAMANN et al. (1954 a + b) wurde die Theorie aufgestellt, daß die Ionen der Seltenen Erden wie Phosphatasen

wirken und besonders die phosphorylierten Hexosen und Triosen des intermediären Kohlenhydratstoffwechsels spalten und so zur Hypoglykämie führen. Diese in vitro -Hydrolyse findet nur bei höherem pH (außerhalb des physiologischen Bereichs) und hohem Metallionenkonzentrationen ($\geq 10^{-3}$ M) statt, die in vivo kaum erreicht werden dürften. Auch die Spaltungsrate ist gering; die höchste wurde für Gluc-1-ph durch Cer bei einer Konzentration von 10^{-3} M bei pH 8,6 gefunden und betrug nach 48 h Inkubation bei 37 °C nur 21 %. Da Beweise aus in vivo Versuchen für diese Hypothese fehlen, muß ihre Richtigkeit dahingestellt bleiben.

HOLTEN et al. berichteten 1966 über den in vitro -Einfluß Seltener Erdmetalle auf gereinigte Enzyme des Kohlenhydratstoffwechsels. Die Autoren fanden nur in phosphatfreien Medien eine Hemmung von LDH, Aldolase, Gluc-6-ph-DH, Isocitrico-DH, MDH und GlDH zwischen 80 % und 100 %. Die dazu benötigten Ionenkonzentrationen betrugen 0,8 x 10^{-3} M. Diese Befunde wurden als unspezifischer Schwermetallioneneffekt gedeutet, der für die Wirkung in vivo nicht verantwortlich sein kann, da alle Elemente der Lanthaniden in vitro eine Hemmung verursachten, während nur die ersten vier der Reihe zu einer Leberdystrophie führen.

Wegen der schweren degenerativen Veränderungen der Leber ist es naheliegend, eine Hemmung der hepatischen Gluconeogenese als Ursache der Hypoglykämie anzunehmen. Dies vermuteten auch FISCHLER und ROECKL (1938), ohne allerdings entsprechende experimentelle Daten mitzuteilen. Eine Beteiligung des Insulins an der Entstehung der Hypoglykämie ist unwahrscheinlich, da einerseits die Konzentration der freien Fettsäuren im Blut erhöht ist (SNYDER und STEPHENS 1961) und andererseits die direkte Bestimmung der Insulinkonzentration im Pfortaderblut keinen Unterschied gegenüber unbehandelten Tieren zeigte (OBERDISSE et al. 1973 a).

In der vorliegenden Arbeit wurde daher der Versuch unternommen, den Einfluß der Seltenen Erden auf den Kohlen-

hydratstoffwechsel der Leber in vivo zu untersuchen und einen möglichen Defekt im Kohlenhydratstoffwechsel quantitativ zu erfassen. Als Parameter wurden die Aktivitäten der gluconeogenetischen Schlüsselenzyme (Pyruvat-Carboxylase, Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase, Fructose-1,6-diphosphatase und Glucose-6-phosphatase) sowie die Glucoseproduktion aus Pyruvat in Leberschnitten gewählt. Darüberhinaus wurden auch die Aktivitäten von Schlüsselenzymen der Glykolyse (Phosphofructokinase, Pyruvatkinase) und des oxydativen Teils des Pentosephosphatweges (Gluc-6-ph-Dehydrogenase, 6-ph-Gluconat-Dehydrogenase) bestimmt.

Die Toxizität und die Leberverfettung durch Seltene Erden lassen sich nach Vorbehandlung mit induzierenden und lebervergrößernden Pharmaka wie Phenobarbital und α-Hexachlorcyclohexan vermindern (HOCHSTRATE und OBERDISSE 1970, OBERDISSE 1970 a, GRAJEWSKI). Daher wurde in einem Teil der Versuche zusätzlich die Wirkung einer kombinierten Applikation von α-HCH und Seltenen Erden auf bestimmte Reaktionen des Kohlenhydratstoffwechsels untersucht, auch wenn bei dieser Vorbehandlung die Hypoglykämie nur geringfügig beeinflußt wird (RÖHLING).

Zwischen des Salzen des Lanthan, Cer, Praseodym und Neodym bestehen qualitativ und quantitativ keine wesentlichen Unterschiede hinsichtlich ihrer biologischen Wirkung (KYKER und CRESS 1957, BRUCE et al. 1963, MAGNUSSON 1963). Alle Versuche wurden mit dem dritten Element dieser Reihe, Praseodym, durchgeführt.

B Methoden

I Tiermaterial, Reagenzien, Vorbehandlung

Als Versuchstiere dienten weibliche WISTAR-Ratten im Gewicht von 120 bis 140 g, die bis zum Versuchsbeginn Standardfutter (Altromin^{R}) und Leitungswasser ad libitum erhielten. Da die mit Praseodym behandelten Tiere kaum noch Futter zu sich nehmen (FISCHLER und ROECKL 1938, SNYDER und STEPHENS 1961), wurden die meisten Versuche unter Hungerbedingungen durchgeführt. Die Dauer der Hungerperioden ist bei der Besprechung der einzelnen Versuche angegeben.

Praseodymnitrat wurde von der Firma Schuchardt (München) und α-Hexachlorcyclohexan von der Firma Fluka (Buchs/Schweiz) bezogen. Actinomycin D stellte freundlicherweise Dr. K.H. BEYER, Merck, Sharp & Dohme (Rayway, N.J. USA) zur Verfügung. Alle biochemischen Reagenzien (Enzyme, Coenzyme und Substrate) sowie Triäthanolamin-HCl waren von der Firma Boehringer/Mannheim, die übrigen Chemikalien in p. a. Qualität von der Firma Merck (Darmstadt).

Praseodymnitrat-pentahydrat ($Pr(NO_3)_3 \times 5\ H_2O$) wurde in 0,9 % NaCl gelöst und intravenös injiziert (Injektionsvolumen 0,5 ml/100 g Körpergewicht). Die applizierten Dosen betrugen zwischen 1 mg/kg und 15 mg/kg Pr-Nitrat, entsprechend 0,3 mg/kg bis 4,5 mg/kg Kation. Die im Text angegebenen Dosierungen beziehen sich immer auf mg/kg Kation.

α-Hexachlorcyclohexan wurde als 2 %ige Lösung in Rapsöl per os in einer Dosierung von 200 mg/kg Körpergewicht verabreicht.

Actinomycin D, in 0,9 % NaCl gelöst, wurde intraperitoneal injiziert. Die verwendeten Dosen sind bei der Besprechung dieser Versuche angegeben.

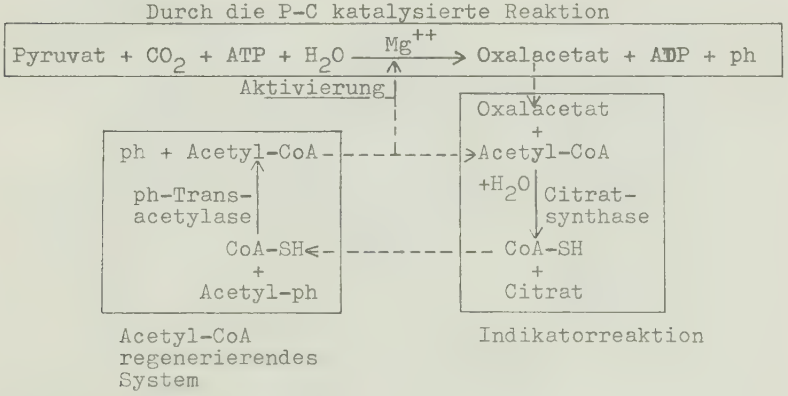
Um tageszeitliche Schwankungen weitgehend auszuschließen, wurden die Tiere für alle Experimente morgens zwischen 9 h und 11 h vorbehandelt und zur gleichen Tageszeit nach verschiedenen Zeitintervallen durch Dekapitieren

getötet. Lediglich in den Versuchen, die nicht in 24 h Abständen durchgeführt wurden, wurde der Zeitpunkt der Vorbehandlung so gewählt, daß die Tiere zwischen 16 h und 20 h in den Versuch genommen werden konnten. Nach Entbluten der Tiere wurden die benötigten Organe bei 4 °C herauspräpariert und anschließend einer Zellfraktionierung unterworfen. Dazu wurden Homogenate unterschiedlicher Konzentration und mit verschiedenen Medien in einem POTTER-ELVEHJEM-Homogenisator hergestellt. Die Unterschiede sind im einzelnen unter "Enzymaktivitätsbestimmungen " angegeben.

II Enzymaktivitäsbestimmungen

1. Pyruvat-Carboxylase

Die Bestimmung der Pyruvat-Carboxylase-Aktivität (P-C) in der Leber erfolgte in Anlehnung an HENNING und SEUBERT (1964) mit geringer Modifikation. Da nach BÖTTGER et al. (1969) und WEISS et al. (1971) die P-C der Rattenleber überwiegend in den Mitochondrien lokalisiert ist, wurde das Homogenat (etwa 10 %ig in 0,1 M Tris-HCl pH 7,2 mit 1,6 mM red. Glutathion) zur Extraktion des Enzyms mit Ultraschall (M.S.E. - Ultraschalldesintegrator Modell 60 w) behandelt und anschließend bei 100 000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde zur Aktivitätsmessung eingesetzt. Die Testzusammensetzung erläutert das folgende Schema:



Acetyl-CoA, das zur vollen Aktivität der P-C benötigt wird (UTTER und KEECH 1963, HENNING und SEUBERT 1964), wird im Testansatz aus CoA-SH, Acetyl-ph und ph-Transacetylase gebildet. Gleichzeitig dient es als Acceptor für das (instabile) Reaktionsprodukt Oxalacetat, das mit Citratsynthase in Citrat überführt wird. Ein Überschuß an Acetylphosphat hält die Acetyl-CoA-Konzentration konstant.

Nach den Angaben von HENNING und SEUBERT wird bei Verwendung von ^{14}C-Pyruvat das Endprodukt - ^{14}C-Citrat - hochspannungselektrophoretisch abgetrennt und im Flüssigkeits-Szintillationszähler bestimmt. Von STÖRMER et al. (1970) wird ein anderes Verfahren zur Abtrennung des ^{14}C-Citrat über eine Silbersalzfällung nach LÖFFLER und WIELAND (1963) angegeben.

In dieser Arbeit wurde auf die Verwendung radioaktiv markierten Pyruvats verzichtet und das entstandene Citrat direkt im optischen Test mit Citratlyase und Malatdehydrogenase nach DAGLEY (1970) bestimmt. Der Pyruvatumsatz in Leberhomogenaten durch die P-C ist ausreichend, um spektrophotometrisch bestimmt werden zu können. Citratlyase aus Aerobacter aerogenes (E.C. 4.1.3.6) spaltet Citrat in Oxalacetat und Acetat. Oxalacetat wird dann mit MDH und NADH im Überschuß zu Malat reduziert.

Ein Ansatz zur Aktivitätsmessung der P-C enthielt in 0,6 ml Endvolumen: 50 µmol Tris-HCl pH 7,2, 1 mg Serumalbumin, 5 µmol $KHCO_3$, 5 µmol $MgSO_4$, 1,4 µmol ATP, 0,6 µmol Na-Pyruvat, 0,43 µmol Coenzym A, 2,5 µmol Acetylphosphat, 2,4 U Phosphotransacetylase (E.C. 2.3.1.8), 0,3 U Citratsynthase (E.C. 4.1.3.7) und 0,05 ml Homogenat (100 bis 200 µg Protein). Nach einer Inkubation von 30 min bei 30 °C wurde die Reaktion durch Zugabe von 0,2 ml 10 % $HClO_4$ beendet, das denaturierte Protein durch Zentrifugieren entfernt, der Überstand mit KOH neutralisiert und der Citratgehalt in 0,5 ml bestimmt.

Der Testansatz zur Citratbestimmung bestand aus 2,0 ml 0,5 M Imidazolpuffer pH 7,0, o,5 ml Probe, 0,05 ml 8 mM NADH, 0,01 ml MDH (5mg/ml), 0,02 ml Citratlyase (40 mg

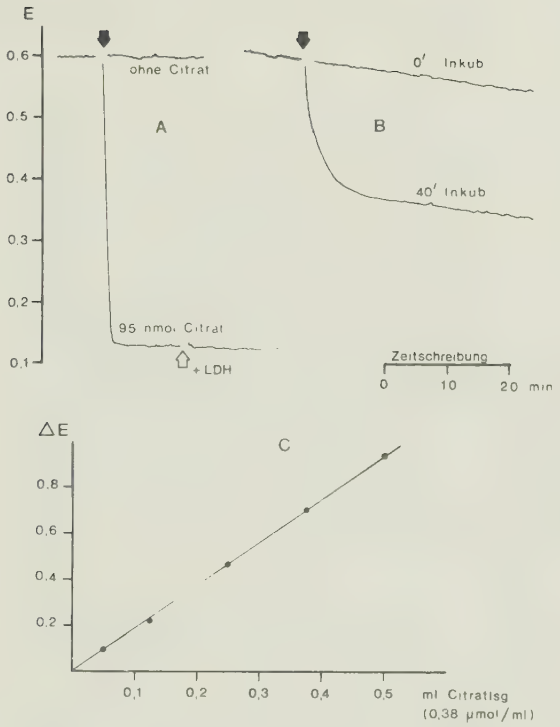


Abbildung 1

Citratbestimmung im optischen Test mit Citratlyase

Endvolumen 2,58 ml, Schichtdicke 4,0 cm, λ = 366 nm

A und B: Orginalpausen fortlaufender Registrierungen der Messung des Citratgehaltes einer Eichlösung mit K_3-Citrat (A) und von Reaktionsansätzen der ^{32}P-C nach 0' und 40' Inkubation (B).

⬇ Start der Reaktion mit 0,02 ml Citratlyase.

C: Eichkurve mit K_3-Citrat von 19 bis 190 nmol.

Lyophilisat in 1,0 ml 0,01 M Triäthanolaminpuffer pH 7,0 mit 6 g% $(NH_4)_2SO_4$ und 2 mg% $ZnCl_2$). Die Messungen erfolgten in einer 4 cm Küvette bei 366 nm in einem Photometer Eppendorf. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Citratlyase ausgelöst.

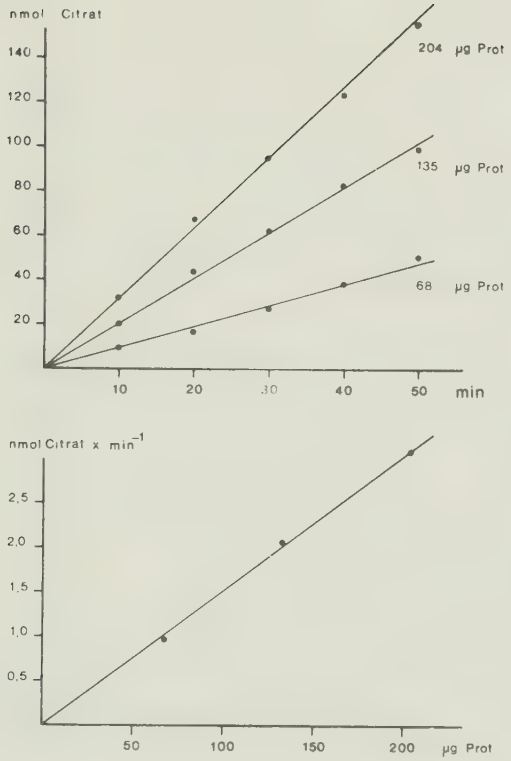
Im Vergleich zu Eichlösungen mit K_3-Citrat war bei der Bestimmung des Citratgehaltes der Reaktionsansätze die Umsatzgeschwindigkeit der Citratlyase deutlich verlangsamt (Abb. 1, A und B). Eine merkliche Autoxydation des NADH (Abb. 1, B) wurde bei der Versuchsauswertung entsprechend korrigiert. Die von Boehringer/Ma. bezogene Citratlyase erwies sich frei von Oxalacetat-Decarboxylase; ebenso war keine spontane Decarboxylierung von Oxalacetat während der Messung zu beobachten. Zugabe von LDH nach Ablauf der Reaktion ergab keinen weiteren Abfall der Extinktion (Abb. 1, A). Entgegen den Angaben von DAGLEY (1970) konnte daher auf den Zusatz von LDH verzichtet werden. Anderenfalls wäre die Citratbestimmung nicht möglich gewesen, da in der Probe wesentlich mehr Pyruvat als Citrat enthalten ist.

Eine Eichreihe mit K_3-Citrat war über einen Bereich von 20 bis 200 nmol linear (Abb. 1, C). Der Variabilitätskoeffizient der einzelnen Citratbestimmung (mit K_3-Citrat) lag bei $v = \pm 0{,}8$ % ($n = 12$).

Zur Aktivitäsmessung der P-C wurden jeweils Dreifachbestimmungen einer Präparation sowie ein Nullwert angesetzt; linearer Umsatz über 5 bis 50 min bei einem Proteingehalt von 70 bis 200 µg war gewährleistet (Abb. 2). In Kontrollansätzen ohne Pyruvat war kein Citrat nachweisbar. Für die Mehrfachbestimmung einer Präparation wurde ein Variabilitätskoeffizient $v = \pm 4{,}5$ % ($n = 10$) gefunden.

2. Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase

Die Bestimmung der Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase-Aktivität (PEP-CK) erfolgte nach Angaben von SEUBERT und HUTH (1965). Als Enzymquelle diente der 100 000g Überstand



Abbilung 2

Kinetik der Pyruvat-Carboxylase in rohen Leberhomogenaten.

oberes Diagramm: Abhängigkeit der Enzymaktivität von der Inkubationszeit.

unteres Diagramm: Abhängigkeit der Enzymaktivität vom eingesetzten Proteingehalt des Extraktes.

(Hyaloplasma) eines etwa 10 %igen Homogenates in 0,1 M Tris pH 7,2.

Ein Testansatz enthielt in 1,05 ml Endvolumen 50 µmol Tris-HCl pH 8,1, 18 µmol $MgSO_4$, 15 µmol KCl, 1 µmol reduziertes Glutathion, 6 µmol Inosintriphosphat, 4,5 µmol Oxalacetat, 15 µmol NaF und 0,05 ml Hyaloplasma (ca. 300 bis 500 µg Protein). Nach einer Inkubationsdauer von 15 min bei 30 °C wurde die Reaktion durch Zugabe von 0,1 ml einer ca. 12 % KBH_4-Lösung beendet. Dabei werden nicht umgesetztes Oxalacetat sowie das während der Inkubation durch spontane Decarboxylierung aus Oxalacetat entstandene Pyruvat zu Malat und Lactat reduziert. Überschüssiges KBH_4 wurde anschließend mit 0,3 ml 6 % $HClO_4$ - unter Zugabe von 5 µl Oktanol zur Vermeidung einer Schaumbildung - entfernt. Im zentrifugierten Überstand wurde der Phsophoenolpyruvatgehalt im optischen Test über Pyruvat mit LDH und NADH (CZOK und LAMPBRECHT 1970) bestimmt. In Kontrollversuchen mit bekannten Mengen Oxalacetat, Pyruvat und Phosphoenolpyruvat waren nach Zugabe von KBH_4 Oxalacetat und Pyruvat enzymatisch nicht mehr nachweisbar, während Phsophoenolpyruvat quantitativ wiedergefunden wurde.

Die eingesetzten Substratkonzentrationen erwiesen sich als optimal. Das Oxalacetat wurde unmittelbar vor Versuchsbeginn gelöst. Unter den gegebenen Testbedingungen (0,05 M Tris-HCl pH 8,1 mit Zusätzen und 30 °C Inkubationstemperatur) wurde für Oxalacetat eine Halbwertszeit von ca. 15 min gefunden.

Zur Aktivitätsmessung der PEP-CK wurden jeweils Doppelbestimmungen durchgeführt. Linearer Umsatz bis 20 min bei einem Proteingehalt von 100 bis 350 µg war gewährleistet (Abb. 3). Die Präzision der Messung einer Enzympräparation lag bei $\pm$ 3,3 % (n = 8).

Die Bestimmung des Phosphoenolpyruvatgehaltes erfolgte in 4 cm Küvetten bei 366 nm. Ein Ansatz bestand aus: 2,0 ml 0,5 M Triäthanolaminpuffer mit 5 mM EDTA pH 7,6, 0,5 ml Probe, 0,05 ml 6 mM NADH, 0,01 ml LDH (5 mg/ml), 0,02 ml 125 mM ADP, 0,02 ml 3,7 M KCl, 0,05 ml 0,5 M $MgSO_4$ und 0,01 ml Pyruvatkinase (10 mg/ml). Die Extinktionen

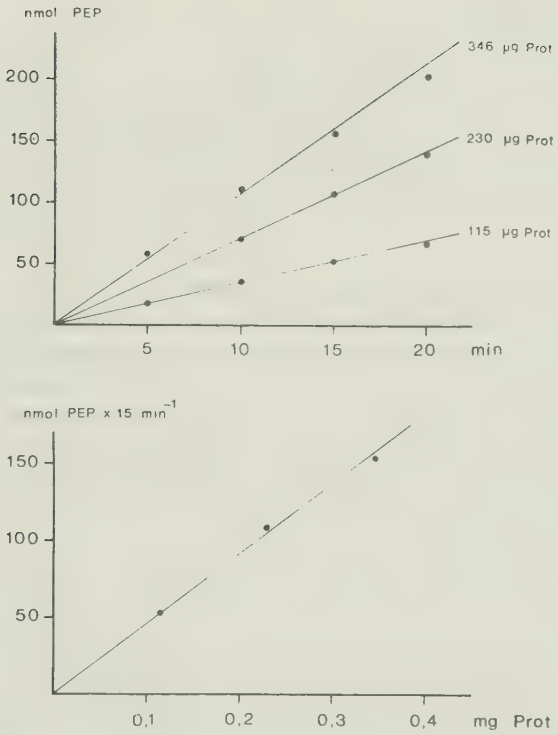


Abbildung 3

Kinetik der Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase im Leberhyaloplasma von Ratten.

Oberes Diagramm: Abhängigkeit der Enzymaktivität von der Inkubationszeit.

Unteres Diagramm: Abhängigkeit der Enzymaktivität von der eingesetzten Proteinmenge.

vor Zugabe der P-K und nach Stillstand der Reaktion wurden notiert und die Differenz zur Berechnung eingesetzt.

3. Glucose-6-phosphatase

Die Aktivität der Glucose-6-phosphatase (Gluc-6-ph-ase) wurde nach den Angaben von BAGINSKI et al. (1970) bestimmt. Als Enzymquelle diente eine in 0,25 M Saccharose mit 1 mM EDTA pH 7,0 isolierte Mikrosomensuspension (100 000 g Sediment der postmitochondrialen Fraktion). Ein Testansatz enthielt in 0,4 ml Endvolumen: 25 µmol Saccharose, 0,1 µmol EDTA pH 7,0, 10 µmol Glucose-6-ph, 10 µmol Na-Kacodylatpuffer pH 6,5 und 0,1 ml Mikrosomensuspension (50 bis 150 µg Protein). Die Ansätze wurden bei 37 °C über 10 min inkubiert, die Reaktion mit 2,0 ml Ascorbinsäure/TCA (2 %/10 %) beendet und im zentrifugierten Überstand der Phosphatgehalt nach BAGINSKI et al. (1970) bestimmt. Der sich in Arsenit-Citrat-Lösung entwickelnde Phosphomolybdatkomplex wurde bei 691 nm in einem Photometer Eppendorf gemessen. Eine Eichkurve mit KH_2PO_4 war bis 50 nmol Phosphat/ml linear.

4. Fructose-1,6-diphase, ph-Fructokinase, Fruc-1,6-diph-aldolase, Glycerinaldehyd-ph-DH, Glycerin-ph-DH, Pyruvatkinase, Lactat-DH, Glucose-6-ph-DH und 6-ph-Gluconat-DH

Die Bestimmung dieser Enzymaktivitäten entsprach den Angaben von BÜCHER et al. (1964). Als Enzymquelle diente der 100 000 g Überstand des etwa 15 %igen Homogenates in 0,15 M KCl.

Alle Messungen erfolgten im einfachen oder zusammengesetzten optischen Test. Mit Ausnahme der Fruc-1,6-diphosphatase und der GAP-DH entsprachen die Testanordnungen der Flußrichtung der Glykolyse beziehungsweise des Pentosephosphatweges. Benötigt das zu messende Enzym nicht selbst NADH (GP-DH und LDH) oder NADP (Gluc-6-ph-DH, 6-ph-Glucon-DH), so werden bis zur nächsten pyridinnukleotidabhängigen Reaktion alle fehlenden Enzyme im Überschuß zugesetzt. Die Enzymaktivität der ph-Fructokinase und der Fruc-1,6-diph-aldolase wurden über Glycerin-ph mit NADH erfaßt, die der Fruc-1,6-diphase über Gluc-6-ph

mit NADP. Die Bestimmung der Pyruvat-kinase erfolgte über Pyruvat mit NADH. Die Messung der GAP-DH wurde im sogenannten " Rücktest " (BEISENHERZ et al. 1953) durchgeführt. In diesem Fall ist eine Hilfsreaktion (Bildung des (instabilen) Substrates 1,3-diph-Glycerinsäure aus 3-ph-Glycerat und ATP) der zu messenden Enzymreaktion vorgeschaltet. Die Messung der GAP-DH in der "Hinreaktion" mit Glycerinaldehyd-ph und NAD ist bei Verwendung roher Leberhomogenate nicht möglich, da die gleichzeitig anwesenden Trioseisomerase und Glycerin-ph-DH das entstandene NADH wieder verbrauchen würden.

Alle Enzymaktivitätsbestimmungen wurden in 0,05 M Triäthanolaminpuffer mit 0,005 M EDTA pH 7,6 durchgeführt. Das Küvettenendvolumen betrug einheitlich 3,4 ml, die Schichtdicke 1,0 cm und die Inkubationstemperatur 25 °C. Die Extinktionsänderungen wurden bei 366 nm mit einem Photometer Eppendorf über einen Kompensationsschreiber fortlaufend registriert und graphisch ausgewertet. Im einzelnen enthielten die Testansätze für die verschiedenen Enzyme folgende Zusammensetzungen (die Angaben beziehen sich auf die Endkonzentrationen):

Fruc-1,6-diphase

0,6 mM Fruc-1,6-diph, 8 mM Mg^{++}, 0,3 mM NADP, 5 mM Cystein, ca. 4 U ph-Glucoseisomerase, ca. 5 U Gluc-6-ph-DH und 0,1 ml Hyaloplasma (200 bis 400 µg Prot.). Start der Reaktion durch Zugabe des Hyaloplasma.

ph-Fructokinase

8 mM Fruc-6-ph, 0,22 mM NADH, 1,5 mM ATP, 8 mM Mg^{++}, ca. 2 U Fruc-1,6-diph-ald, ca. 1 U Glycerin-ph-DH, ca. 9 U Trioseisomerase und 0,1 ml Hyaloplasma (500 bis 700 µg Prot.). Start der Reaktion mit Fruc-6-ph.

Fruc-1,6-diph-aldolase

4 mM Fruc-1,6-diph, 0,22 mM NADH, ca. 1 U PG-DH, ca. 9 U TIM und 0,1 ml Hyaloplasma (200 bis 300µgProt.). Start der Reaktion mit Fruc-1,6-diph.

Glycerin-ph-DH

0,4 mM Dioxyaceton-ph, 0,22 mM NADH und 0,1 ml Hyaloplasma (50 bis 80 µg Prot.). Start der Reaktion mit Dioxyaceton-ph.

Glyceraldehyd-ph-DH

7 mM 3-ph-Glycerat, 0,22 mM NADH, 1,5 mM ATP, 3,3 mM Mg^{++}, ca. 10 U ph-Glycerat-kinase, 2,4 mM reduziertes Glutathion. Start der Reaktion mit 0,1 ml Hyaloplasma (20 bis 40 µg Prot.).

Pyruvatkinase

2,4 mM ph-Enolpyruvat, 0,22 mM NADH, 1,5 mM ADP, 8 mM Mg^{++}, ca. 5 U LDH, 75 mM KCl. Start der Reaktion mit 0,1 ml Hyaloplasma (100 bis 200 µg Prot.).

Lactat-DH

2,4 mM Pyruvat, 0,22 mM NADH und 0,1 ml Hyaloplasma (5 bis 8 µg Prot.). Start durch Zugabe von Pyruvat.

Gluc-6-ph-DH

2,0 mM Gluc-6-ph, 0,3 mM NADP und 0,1 ml Hyaloplasma (500 bis 800 µg Prot.). Start mit Gluc-6-ph.

6-ph-Gluconat-DH

1,0 mM 6-ph-Gluconat, 8 mM Mg^{++}, 0,3 mM NADP und 0,1 ml Hyaloplasma (300 bis 500 µg Prot.). Start der Reaktion mit 6-ph-Gluconat.

Für alle Enzyme mit Ausnahme der ph-Fructokinase waren die eingesetzten Substrat- und Coenzymkonzentrationen optimal. Änderungen der Endkonzentrationen um $\pm$ 50 % ergaben keine Änderung der Enzymaktivität. Eine lineare Abhängigkeit von der eingesetzten Proteinmenge war gewährleistet.

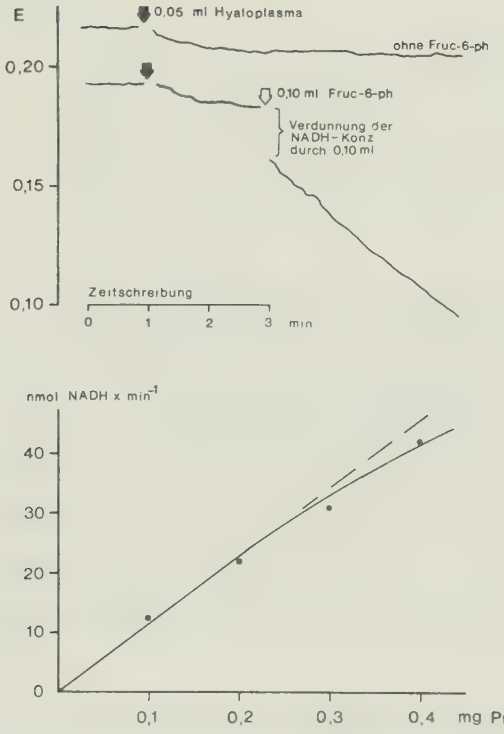


Abbildung 4

Kinetik der ph-Fructokinase im Leberhyaloplasma

Oberes Diagramm: Orginalpause fortlaufender Registrierungen mit und ohne Fruc-6-ph als Substrat.

Unteres Diagramm: Abhängigkeit der Enzymaktivität von der eingesetzten Proteinmenge.

Unter diesen Bedingungen verlief bei der Fruc-1,6-diph-ald, der GP-DH, GAP-DH und P-K der Umsatz geradlinig (Reaktion Nullter Ordnung). Bei der LDH und 6-ph-Glucon-DH nahm die Reaktionsgeschwindigkeit gering, aber stetig ab, bei der Gluc-6-ph-DH dagegen zu. Der letztere Umstand ist durch die im Testansatz gleichzeitig anwesende 6-ph-Glucon-DH bedingt, die das Produkt der Meßreaktion, 6-ph-Gluconat, ebenfalls in einer NADP-abhängigen Reaktion umsetzt, allerdings verzögert und mit wesentlich geringerer Geschwindigkeit. Das gleiche trifft für die Fruc-1,6-diphase zu, deren Bestimmung auch über Gluc-6-ph mit Gluc-6-ph-DH erfolgte.

Für die Messung der ph-Fructokinase können nur schwer optimale Substratkonzentrationen eingehalten werden, da Substrate und Produkte das Enzym teils hemmen (ATP) und teils aktivieren (Fruc-6-ph, ADP, ph) und sich in ihrer Wirkung gegenseitig beeinflussen (PASSONNEAU und LOWRY 1964, UNDERWOOD und NEWSHOLME 1965). In der hier gewählten Testanordnung war der Umsatz dennoch bis 3 min Inkubation annähernd linear. Analoges gilt für Proteinkonzentrationen bis 0,3 mg pro Test (Abb. 4).

In allen Fällen nichtlinearer Reaktionskinetik erfolgte die Auswertung durch Anlegen der Tangente in den Anfangsteil der Kurven.

5. Berechnung der Enzymaktivitäten

In dieser Arbeit werden alle gemessenen Enzymaktivitäten in U oder mU angegeben. Eine Enzymeinheit (U) katalysiert den Umsatz von 1 µmol Substrat in einer Minute bei konstanter Temperatur. Bezugsgröße ist der mit der Präparation extrahierte Proteinanteil, der getrennt bestimmt wurde.

Mit Ausnahme der Gluc-6-ph-ase wurden alle Enzymaktivitätsmessungen im optischen Test durchgeführt. Die Berechnung für diese Enzyme erfolgte einheitlich nach folgender Gleichung:

$$U \times mg\ Prot^{-1} = \frac{\triangle E \times v}{\epsilon \times d \times t \times p} \times F \left[\frac{\mu mol \times ml}{cm^2 \times cm \times min \times mg} = \frac{\mu mol}{min \times mg} \right].$$

Dabei bedeuten:

$\triangle E$	Meßgröße (Extinktionsänderung für eine vorgegebene Inkubationszeit)
v	Küvettenendvolumen in ml
ϵ	Extinktionskoeffizient von NADH oder NADPH, für λ = 366 nm wurde der Wert 3,3 $cm^2 \times \mu mol^{-1}$ verwendet.
d	Schichtdicke der Küvette in cm
t	Inkubationszeit in min
p	in den Test eingesetzte Proteinmenge in mg
F	Verdünnungsfaktor für die Testansätze, bei denen nach der Inkubation in einem Aliquot das Reaktionsprodukt gemessen wurde (P-C, PEP-CK).

$$F = \frac{\text{Endvolumen des Reaktionsansatzes in ml}}{\text{zur Messung eingesetztes Aliquot in ml}}$$

Für die direkten Messungen im kinetischen Test ist F = 1

Bei der Berechnung der Fruc-6-ph-kin und Fruc-1,6-diph-ald mußte das Ergebnis durch zwei geteilt werden, da vor der Messung die C_6-Substrate in zwei C_3-Körper gespalten werden und somit der doppelte Umsatz registriert wurde.

III Glucoseproduktion in Schnitten

Die gluconeogenetische Kapazität der Leber wurde an 0,2 bis 0,3 mm dicken Schnitten geprüft. Die Schnitte wurden aus freier Hand mit einer Rasierklinge im spitzen Winkel zur Unterlage angefertigt. Etwa 100 mg Schnitte (Feuchtgewicht) wurden in 4 ml Bicarbonat-Ringer-Lösung nach KREBS-HENSELEIT (pH 7,4) unter 95 % O_2 und 5 % CO_2 bei 37 °C und einer Schüttelfrequenz von etwa 100 pro min inkubiert. Als Substrat diente Pyruvat in 10^{-2} M Anfangskonzentration. Kontrollansätze enthielten kein Pyruvat. Zu verschiedenen Zeiten wurden je 0,2 ml Inkubationsmedium entnommen, in 1,0 ml 0,3 N $HClO_4$ enteiweißt und der Glu-

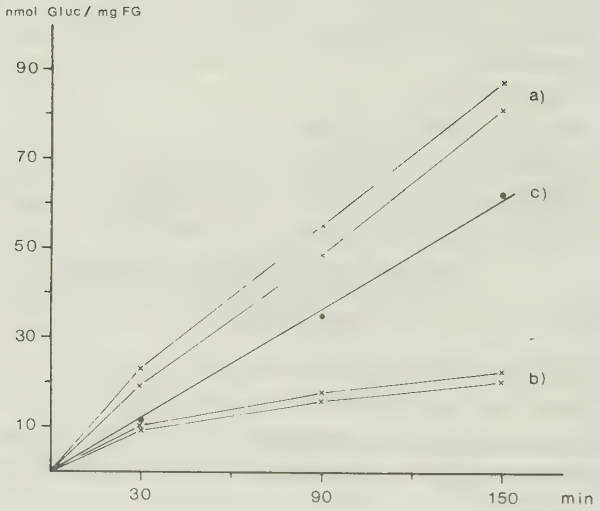


Abbildung 5

Glucoseproduktion von Leberschnitten

a): zwei Ansätze mit Pyruvat in 10^{-2} M Anfangskonzentration

b): zwei Ansätze ohne Pyruvat

c): Differenz der Mittelwerte von a) und b): Nettoglucoseproduktion

cosegehalt im Überstand bestimmt. Aus der Glucoseproduktion der Schnitte pro h mit und ohne Pyruvat wurde die Differenz gebildet. Sie wird als Nettoglucoseproduktion bezeichnet und und zeigte eine lineare Abhängigkeit bis 150 min nach Inkubationsbeginn (Abb. 5). Als Bezugsgröße diente das Feuchtgewicht der Schnitte. Mit Schnitten einer Leber wurden gleichzeitig vier Ansätze inkubiert. Vom Zeitpunkt der Dekapitation an wurden dafür etwa fünf Minuten benötigt.

Die Messung der Gluconeogeneserate in Nierenrindenschnitten erfolgte unter gleichen Bedingungen wie bei der Leber. Die Glucoseabgabe ohne Substrat war gering und konnte vernachlässigt werden.

IV Glucosebestimmung

Die Glucose wurde nach Enteiweißung in 0,3 N $HClO_4$ mit der Glucoseoxydase-Methode bestimmt (GOD-Perid-Testkombination Boehringer/Ma). Das Prinzip der Reaktion besteht in der enzymatischen Oxydierung der Glucose zu Gluconsäure unter Bildung von H_2O_2. Das Wasserstoffperoxid oxydiert in Gegenwart von Peroxydase einen reduzierten Farbstoff (2,2'-Azino-di- 3-äthyl-benzthiazolinsulfonsäure-(6) -diammonium) zu einer blaugrünen Verbindung, deren Farbintensität bei 436 nm gemessen wurde.

V Proteinbestimmung

Die Bestimmung des Proteingehaltes der Enzympräparationen erfolgte mit der Biuretreaktion (BEISENHERZ et al. 1953). Der Cu-Proteinatkomplex wurde bei 546 nm gemessen. Als Standard diente Serum-Rinder-Albumin (Behringwerke/ Marburg-Lahn). Die Eichkurve verlief bis 2,5 mg Albumin/ml linear.

VI Statistische Berechnungen

Aus den Meßwerten gleicher Versuchsgruppen wurden arithmetischer Mittelwert ($\bar{x}$) und Standardabweichung (s) der Einzelwerte berechnet. Unterschiede zweier Mittel

werte wurden mit dem t-Test auf Signifikanz geprüft. Die Prüfgröße t wurde nach der Gleichung

$$t = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{\sqrt{\frac{(n_1-1)s_1^2 + (n_2-1)s_2^2}{n_1 + n_2 - 2}}} \sqrt{\frac{n_1 \times n_2}{n_1 + n_2}}$$

(n = Anzahl der Versuche)

berechnet und mit dem tabellierten Wert - abhängig von der Zahl der Freiheitsgrade $\nu = n_1 + n_2 - 2$ - der vorgegebenen Grenzwahrscheinlichkeit p zur Annahme oder Ablehnung der Nullhypothese verglichen. Als signifikant werden Unterschiede mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit $\alpha < 1\ \%$ ($p < 0{,}01$) angesehen.

C Ergebnisse

I Glucosekonzentration im Blut

Nach intravenöser Injektion von Praseodymnitrat (4,5 mg Kation/kg) sank der Glucosegehalt des Blutes im Verlauf mehrerer Tage von 110 mg % (Kontrollen) über 86 mg % (24 h) auf 41 mg % (48 h) ab. Dieser Verlauf entsprach den in der Literatur publizierten Angaben (z.B. FISCHLER und ROECKL 1938, MAGNUSSON 1963). Da gleichzeitig die Futteraufnahme der Tiere erheblich eingeschränkt war (SNYDER und STEPHENS 1961), mußte geprüft werden, ob es sich bei diesen Veränderungen nicht um einen Hungereffekt handelte. Dabei zeigte sich, daß Praseodym eine direkte Wirkung auf die Blutglucosekonzentration besaß; ließ man die Tiere vom Zeitpunkt der Praseodyminjektion an hungern, sank die Glucosekonzentration im Blut noch stärker ab und lag nach 24 h und 48 h signifikant unter den Werten von Kontrolltieren, die nur gehungert hatten (Abb. 6, Kurve a und b).

In weiteren Versuchen wurde der Einfluß steigender Dosen Praseodym auf den Abfall der Blutglucosekonzentration untersucht. Alle Tiere wurden 24 h nach der Injektion dekapitiert. Innerhalb dieses Zeitraumes fiel die Glucosekonzentration im Blut bis zu einer Dosis von 2 mg Praseodym/kg nahezu linear von 87 mg % (Kontrollen, 24 h Hunger ohne Praseodym) bis auf minimal 62 mg % ab. Bei weiterer Erhöhung der Dosis bis 4,5 mg/kg konnte kein zusätzlicher Effekt verzeichnet werden. Der Blutzuckerabfall bei 2 mg Praseodym/kg war gleich groß wie bei 4,5 mg/kg (Abbilung 9).

II Glucoseproduktion von Leberschnitten

Die gluconeogenetische Kapazität der Leber wurde an Schnitten geprüft. Als Substrat der Gluconeogenese diente Pyruvat (10^{-2} M). Verglichen wurde die Glucoseabgabe in

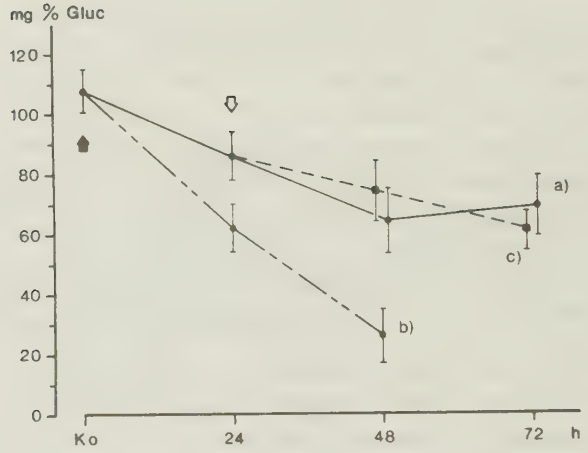


Abbildung 6

Einfluß von Praseodym (4,5 mg/kg) auf die Konzentration der Glucose im Blut.

a): Kontrollen mit Futterentzug

b): Pr und gleichzeitig Futterentzug (⬆ Pr-Injektion)

c): Pr nach einer vorangehenden 24 h Hungerperiode und weiterhin Futterentzug (⇩ Pr-Injektion)

das Inkubationsmedium mit Pyruvatzusatz gegen Kontrollansätze ohne Pyruvat. Die Differenz wird als "Netto-Glucoseproduktion" bezeichnet.

Bei Tieren, die mit 3 mg Praseodym/kg vorbehandelt waren und anschließend kein Futter erhielten, war die Glucoseabgabe stark vermindert (Tabelle 1). 24 h nach der Injektion betrug sie im Mittel noch 4 µmol/g FG x h, etwa 17 % der entsprechenden Kontrollwerte (26 µmol/g FG x h). Zusatz von Pr-Nitrat in das Inkubationsmedium bis zu einer Konzentration von 10^{-4} M hatte keinen Einfluß auf die Netto-Glucoseproduktion der Schnitte. Höhere Konzentrationen konnten nicht eingesetzt werden, da Praseodym bei leicht alkalischem pH unter Bildung schwerlöslicher Phosphate und Carbonate im Inkubationsmedium ausfiel. Die starke Hemmung der Gluconeogenese aus Pyruvat ließ sich somit nur nach Vorbehandlung der Tiere mit Praseodym erreichen.

Eine 24 stündige Vorbehandlung der Tiere mit α-HCH vor der Praseodym-Gabe hatte keinen wesentlichen Einfluß auf die Glucoseabgabe der Schnitte (Tabelle 1). Die dazugehörenden Kontrollwerte (48 h α-HCH, 24 h Futterentzug) lagen dabei um ca. 27 % unter denen der Tiere, die lediglich 24 h gehungert hatten. Dieser Unterschied könnte eventuell durch das Rapsöl bedingt sein, das in nicht unbeträchtlicher Menge (10 ml/kg) als Lösungsvermittler mit dem α-HCH appliziert wurde. Weitere Experimente zur Überprüfung der Frage, inwieweit Rapsöl oder α-HCH die hepatische Gluconeogenese beeinflussen können, wurden nicht durchgeführt.

Interessanterweise war die Hemmung der Gluconeogenese aus Pyruvat auf die Leber beschränkt. Die unter entsprechenden Bedingungen gemessene Glucoseproduktion von Nierenrindenschnitten ergab auch 48 h nach der Injektion keinen Unterschied zu den Kontrolltieren (Tabelle 2). Als Nebenbefund wurde bei den mit Praseodym vorbehandelten Tieren eine signifikante Zunahme des Feucht- wie des Trockengewichtes der Nieren um ca. 25 % beobachtet (ohne Befunddokumentation).

Tabelle 1

Einfluß von Praseodym (3 mg/kg) sowie der kombinierten Vorbehandlung mit α-HCH und Praseodym auf die Glucoseneubildung aus Pyruvat in Leberschnitten.

α-HCH (200 mg/kg) wurde 24 h vor der Praseodym-Injektion verabreicht. Futterentzug gleichzeitig mit der Praseodym-Injektion. Den Kontrollen zu diesen Versuchen wurde 24 h nach α-HCH das Futter entzogen.

Vorbehandlung	n	Glucoseabgabe µmol/g FG x h	% zu den Hungerkontrollen
24 h Futterentzug	7	26,3 ± 3,5	100 %
" " " + Pr (10^{-4} M) im Inkubationsansatz	3	28,5	108 %
Pr 24 h und gleichzeitig Futterentzug	6	4,4 ± 1,9	17 %
α-HCH 48 h und 24 h Futterentzug	4	19,2 ± 2,2	73 %
α-HCH 48 h, Pr 24 h und gleichzeitig Futterentzug	5	4,8 ± 1,2	18 %

Tabelle 2

Glucoseproduktion aus Pyruvat in Nierenrindenschnitten 48 h nach Praseodym-Injektion (3 mg/kg) und gleichzeitigem Futterentzug.

Vorbehandlung	n	Glucoseabgabe µmol/g FG x h
48 h Futterentzug	8	62,4 ± 6,1
Pr 48 h und gleichzeitig Futterentzug	8	65,9 ± 8,4

III Enzymaktivitätsbestimmungen

1. Pyruvat-Carboxylase

Das Verhalten der Pyruvat-Carboxylase (P-C) unter dem Einfluß von Praseodym zeigt Abbildung 7. Das Enzym katalysiert den ersten Schritt der Glucoseneubildung aus Pyruvat, indem CO_2 unter Spaltung von 1 Mol ATP in ADP und Phosphat an Brenztraubensäure fixiert wird. Es entsteht Oxalacetat (SEUBERT und HUTH 1965). Das Enzym ist in der Rattenleber überwiegend in den Mitochondrien lokalisiert (BÖTTGER et al. 1969, WEISS et al. 1971).

Wie aus der Abbildung ersichtlich ist, stieg die Aktivität (mU/mg extrahierten Proteins) während einer Hungerperiode kontinuierlich an. Nach 48 h betrug die Zunahme 80 %. Dieser Wert stimmt gut mit den Angaben von HENNING et al. (1966) sowie STÖRMER et al. (1970) überein. Dagegen sank bei Vorbehandlung mit Praseodym (3 mg/kg) und gleichzeitigem Futterentzug die Aktivität des Enzyms ab. Sie betrug nach 24 h noch 48 %, nach 48 h 20 % und nach 72 h 10 % der entsprechenden Hungerkontrollen. Die Unterschiede sind signifikant ($p < 0{,}001$).

2. Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase

Das Verhalten der Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase (PEP-CK) während der in vivo-Einwirkung von Praseodym ist in Abbildung 8 dargestellt. Das Enzym spaltet aus Oxalacetat CO_2 ab und überträgt gleichzeitig eine energiereiche Phosphatgruppe aus Guanosintriphosphat auf das Zwischenprodukt. Es entsteht Phosphoenolpyruvat. Das Enzym ist in der Rattenleber im Cytosol lokalisiert (NORDLIE und LARDY 1963). Im Hungerzustand fanden sich die gleichen Veränderungen wie bei der P-C, die Enzymaktivität stieg nach 24 h Futterentzug auf fast das dreifache an und blieb dann bis 72 h konstant. Unter Praseodymeinwirkung war eine noch stärkere Abnahme der Enzymaktivität

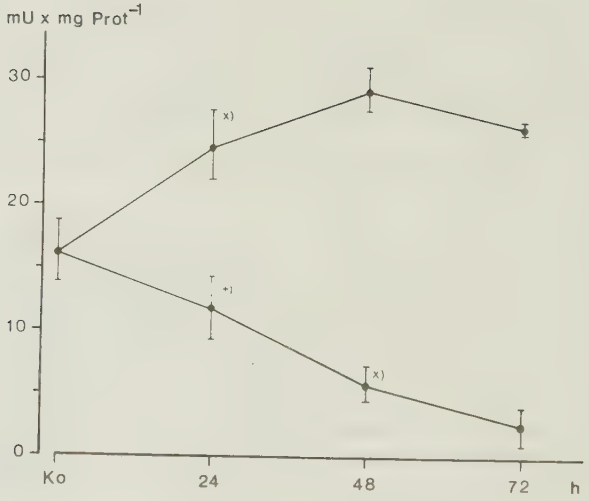


Abbildung 7

Zeitlicher Verlauf der Aktivität der Pyruvat-Carboxylase der Leber im Hungerzustand und nach Praseodym (3mg/kg).

Obere Kurve: Kontrollen mit Futterentzug

Untere Kurve: Pr und gleichzeitig Futterentzug

p zu Kontrollen (Ko = gefütterte Tiere):

+) $< 0{,}005$, x) $< 0{,}001$

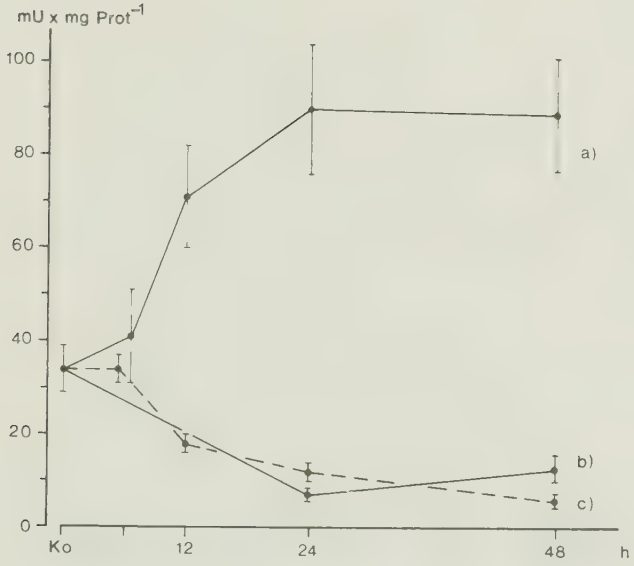


Abbildung 8

Zeitlicher Verlauf der Aktivität der Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase der Leber im Hungerzustand und nach Praseodym (3 mg/kg).

a): Kontrollen mit Futterentzug

b): Praseodym und Futter ad libitum

c): Praseodym und gleichzeitig Futterentzug

als bei der P-C zu beobachten. Bereits nach 24 h war nur noch eine Restaktivität von 13 % im Vergleich zu den Hungerkontrollen nachweisbar. Weiter ist aus der Abbildung ersichtlich, daß in der Aktivitätsabnahme des Enzyms kein Unterschied bestand, wenn den behandelten Tieren das Futter entzogen oder belassen wurde.

Bei Inkubation eines Kontrollhyaloplasma mit Pr-Nitrat in 10^{-4} M Endkonzentration konnte keine Hemmung der Enzymaktivität nachgewiesen werden (Tabelle 3 A). Wurde das Hyaloplasma hungernder Tiere (48 h) mit dem Pr-vorbehandelter Tiere (48 h) vereinigt und inkubiert, so entsprach die Aktivität der kombinierten Hyaloplasmata der Summe der getrennt bestimmten Aktivitäten (Tabelle 3 B). Auch nach einer Vorinkubation eines Hyaloplasma mit Pr in 10^{-4} M Konzentration bei 30 °C über 90 min zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der Enzymaktivität zu dem selben Hyaloplasma, das ebenfalls bei 30 °C 90 min – jedoch ohne Praseodym – inkubiert war. Dabei betrug der Aktivitätsverlust durch die Inkubation nur etwa 10 % vom Ausgangswert (Tabelle 3 C).

Die ausgeprägte Aktivitätsabnahme der PEP-CK ließ sich nur nach in-vivo-Einwirkung von Praseodym nachweisen und beruht offenbar nicht auf einem direkten Einfluß des Schwermetallions auf die PEP-CK oder auf Hemmstoffen, die während der dystrophischen Veränderungen in der Vorbehandlungszeit entstanden sind.

In Abbildung 9 ist der Einfluß steigender Dosen Praseodym auf die Aktivität der PEP-CK nach 24 h Vorbehandlung bei gleichzeitigem Futterentzug dargestellt. Bereits bei einer Dosis von 0,9 mg/kg wurde die durch Hunger ausgelöste Induktion der PEP-CK um etwa 40 % gehemmt. Bei Verdopplung dieser Dosis sank die Enzymaktivität unter die Werte gefütterter Kontrolltiere (29 mU/mg Prot), während die weitere Erhöhung der Dosis keine zusätzliche Wirkung zeigte. Auffällig ist das synchrone Verhalten von Enzymaktivität und Glucosekonzentration im Blut.

A Praseodym-Zusatz zum Inkubationsmedium der PEP-CK (Hyaloplasma eines gefütterten Tieres).	ΔE
ohne Pr	0,35
mit Pr 1×10^{-4} M	0,38
mit Pr 5×10^{-5} M	0,30
B Kombinierte Inkubation von Hyaloplasmata eines hungernden und eines mit Praseodym vorbehandelten Tieres.	ΔE
(a) 48 h Futterentzug	0,77
(b) 48 h Pr und Futterentzug	0,02
Gemeinsame Inkubation der Hyaloplasmata (a) und (b) im gleichen Testansatz	0,79
C Aktivität der PEP-CK nach einer Vorinkubation bei 30 °C über 90 min mit und ohne Praseodym (Hyaloplasma eines Tieres nach 18 h Futterentzug).	ΔE
Aktivitätsmessung sofort nach Beendigung der Präparation	0,97
Aktivität nach 90 min bei 30 °C	0,86
Aktivität nach 90 min bei 30 °C in Anwesenheit von 3×10^{-4} M Pr	0,84

Tabelle 3

Aktivität der PEP-CK unter verschiedenen in-vitro-Testbedingungen.

Die Leberhyaloplasmata wurden zur Aktivitätsmessung 15 min bei 30 °C inkubiert und der Phosphoenolpyruvatgehalt in einem Aliquot (0,5 ml) des Testansatzes bestimmt. Die angegebenen Extinktionsänderungen (ΔE) sind dem PEP-Gehalt der Proben direkt proportional und ein Maß für die Enzymaktivität der PEP-CK. Auf die Umrechnung der Enzymaktivität in mU und auf den Bezug auf die eingesetzte Proteinmenge wurde verzichtet.

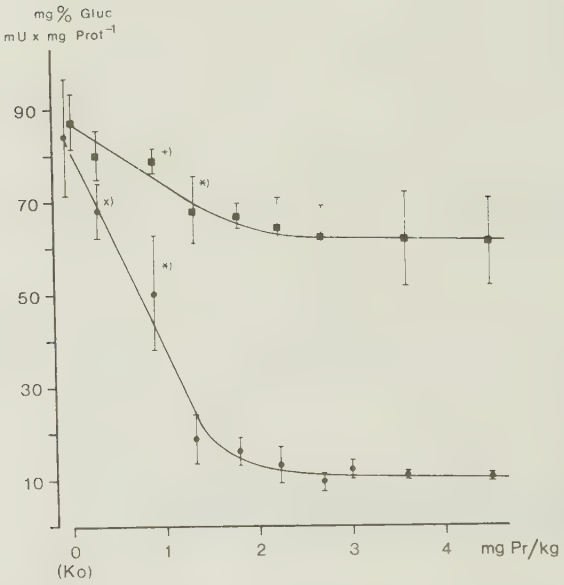


Abbildung 9

Einfluß steigender Dosen Praseodym (0,3 bis 4,5 mg/kg) auf die Konzentration der Glucose im Blut und auf die Aktivität der PEP-CK im Leberhyaloplasma. Den Tieren wurde gleichzeitig mit der Pr-Injektion das Futter entzogen. Untersuchungszeitpunkt 24 h nach Beginn der Vorbehandlung. Kontrollen: 24 h Futterentzug ohne Praseodym.

Obere Kurve: Glucose im Blut (mg %)

Untere Kurve: PEP-CK (mU x mg $Prot^{-1}$)

p zu den Kontrollwerten (Ko, 24 h Hunger):

x): $< 0{,}025$, +): $< 0{,}005$, ⁑): $< 0{,}001$

Tabelle 4 zeigt den Einfluß einer kombinierten Vorbehandlung von α- HCH und Praseodym auf die Aktivitäten der PEP-CK und P-C der Leber. Dabei hatte α-HCH bei der PEP-CK weder auf die durch Hunger ausgelöste Induktion noch auf die durch Praseodym verursachte Hemmung der Enzymaktivität einen Einfluß.

Dagegen waren bei der Pyruvat-Carboxylase die Veränderungen der Enzymaktivität nach Vorbehandlung mit α-HCH weniger ausgeprägt. Einerseits war der Enzymanstieg durch Hunger (48 h) um 33 % geringer, andererseits lagen die Werte bei der kombinierten Behandlung mit Praseodym und α-HCH höher als bei alleiniger Pr-Einwirkung. Daraus resultierte eine verminderte Hemmung der Enzymaktivität von nur 40 % statt 80 % in den vorangegangenen Versuchen.

Nach den Literaturangaben besteht eine ausgeprägte Geschlechtsspezifität in der Wirkung der Seltenen Erden hinsichtlich ihrer Toxizität (BRUCE et al. 1963) und der von ihnen ausgelösten Leberverfettung (SNYDER et al. 1959). Männliche Tiere reagieren weniger empfindlich als weibliche Tiere. Es sollte daher überprüft werden, ob sich analoge Veränderungen im Kohlenhydratstoffwechsel nach Gabe von Praseodym finden lassen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 5 dargestellt. Bei männlichen WISTAR-Ratten im Gewicht von 125 g betrug 24 h nach der Injektion von 3 mg Praseodym/kg der Abfall der Blutglucosekonzentration 13 % und die Aktivität der PEP-CK der Leber nahm nur um 34 % im Vergleich zu den Hungerkontrollen ab, während bei gleichschweren weiblichen Tieren des gleichen Tierstammes die Glucosekonzentration im Blut um 29 % und die Aktivität der PEP-CK um 86 % abfielen.

Auf Grund dieser eindeutigen hormonalen Abhängigkeit der Praseodymwirkung wurden die Versuche an juvenilen weiblichen WISTAR-Ratten mit 40 g Körpergewicht wiederholt. Wie aus Tabelle 5 weiterhin ersichtlich ist, konnte auch in diesem Fall ein deutlich geringerer Abfall von

Enzym	Vorbehandlung	24 h	48 h
PEP-CK	α-HCH + Futterentzug	n = 5 69,2 ± 15,5	n = 5 87,1 ± 17,1
	α-HCH, Pr + Futterentzug	n = 5 13,2 ± 5,8	n = 5 7,4 ± 2,0
P-C	α-HCH + Futterentzug		n = 7 19,6 ± 3,6] +)
	α-HCH, Pr + Futterentzug		n = 5 12,1 ± 3,8]

Tabelle 4

Einfluß der kombinierten Vorbehandlung von α-HCH (200 mg/kg) und Praseodym (3,0 mg/kg) auf die Enzymaktivitäten der PEP-CK und P-C der Leber. Praseodym wurde 24 h nach der α-HCH-Gabe injiziert; gleichzeitig wurde den Tieren das Futter entzogen. Nur mit α-HCH behandelte Tiere dienten als Kontrollen; ihnen wurde ebenfalls 24 h nach der α-HCH-Gabe das Futter entzogen. Auf diesen Zeitpunkt beziehen sich die angegebenen Stundenwerte. Die Enzymaktivität wird in mU/mg Prot angegeben.

+): $p < 0,01$

	weibliche Tiere				männliche Tiere	
	KG 40 ± 5 g		KG 130 ± 10 g		KG 125 ± 8 g	
	BZ mg %	PEP-CK mU/mg Prot	BZ mg %	PEP-CK mU/mg Prot	BZ mg %	PEP-CK mU/mg Prot
a) Kontrollen, gefüttert	n = 10 113 ± 5	n = 4 42 ± 3	n = 10 110 ± 9	n = 7 29 ± 2	n = 6 127 ± 7	n = 6 27 ± 4
b) 24 h Futterentzug	n = 10 76 ± 6	n = 5 124 ± 2	n = 8 87 ± 6	n = 11 84 ± 13	n = 10 89 ± 9	n = 10 75 ± 5
c) Pr 24 h + Futterentzug	n = 9 64 ± 12	n = 5 69 ± 10	n = 8 62 ± 7	n = 7 12 ± 2	n = 8 78 ± 7	n = 8 49 ± 10
% Abnahme [c) - b)]	16 %	43 %	29 %	86 %	13 %	34 %
p c)→b)	<0,01	<0,001	<0,001	<0,001	<0,01	<0,001

Tabelle 5

Einfluß von Praseodym (3,0 mg/kg) auf Blutglucosekonzentration (BZ) und Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase (PEP-CK) im Leberhyaloplasma bei männlichen und weiblichen WISTAR-Ratten. Untersuchungszeitpunkt 24 h nach der Praseodym-Injektion.

Blutglucosekonzentration und PEP-CK als im Vergleich zu den älteren (geschlechtsreifen) Tieren mit 130 g Gewicht verzeichnet werden. Analoge Unterschiede zwischen männlichen und weiblichen Tieren hinsichtlich Toxizität und Leberverfettung bestanden auch zwischen den jüngeren und älteren weiblichen Tieren. Bei der verwendeten Dosis (3 mg/kg) starb von den kleineren Ratten kein Tier, während diese Dosis bei den älteren Tieren (130 g) einer LD_{65} entsprach. Der Grad der Leberverfettung wurde makroskopisch beurteilt, die sichtbaren Unterschiede waren aber groß genug, um zumindest qualitativ eine ausreichende Aussage treffen zu können.

In allen Fällen (weibliche Ratten verschiedenen Gewichts und männliche Ratten) konnte eine signifikante, im Ausmaß allerdings unterschiedliche Wirkung von Praseodym auf Blutglucosekonzentration und Aktivität der PEP-CK nachgewiesen werden. Wie bei der Abhängigkeit von der Praseodymdosis zeigen auch diese Werte eine gute Korrelation zwischen Blutzuckerabfall und Hemmung der PEP-CK. Da aber zu wenig Meßdaten vorliegen, wurde auf eine entsprechende statistische Auswertung verzichtet.

3. Glucose-6-phosphatase

Die Glucose-6-phase ist in der Leber im Endoplasmatischen Reticulum lokalisiert. Auch dieses Enzym wird im Hunger induziert (Abbildung 10 A). Bezogen auf den Proteingehalt der Mikrosomensuspension betrug die Aktivitätszunahme etwa 100 % nach 24 h und 150 % nach 48 h. Unter Praseodym bei gleichzeitigem Futterentzug blieben die Werte dagegen im Bereich der gefütterten Kontrolltiere. Verglichen mit den Hungerkontrollen resultiert daraus immer noch eine relative Verminderung der Enzymaktivität um 65 % bereits nach 24 h (Abb. 8 B, Kurve b).

Futterentzug 24 h nach α-HCH-Gabe zeigte keinen signifikanten Einfluß auf die Enzymaktivität im Ver-

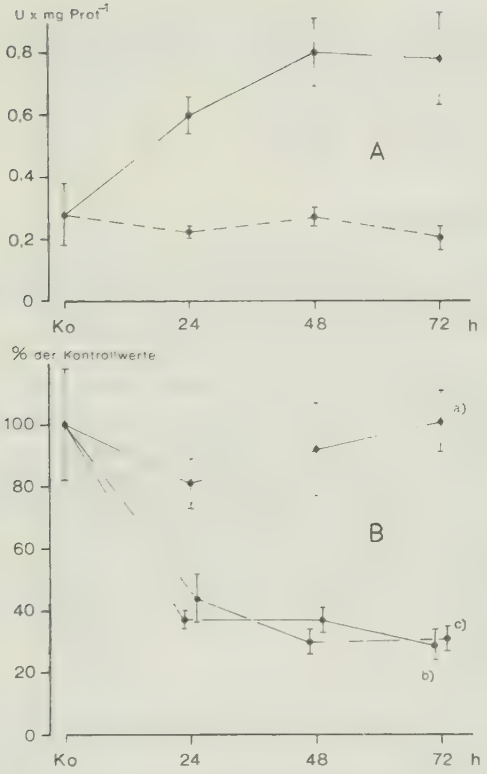


Abbildung 10

Zeitlicher Verlauf der Enzymaktivität der Gluc-6-phase von Lebermikrosomen im Hunger, unter Praseodym (3mg/kg) und bei der kombinierten Behandlung mit α-HCH und Pr.

A: Die ausgezogene Kurve zeigt die Veränderungen bei Futterentzug, die gestrichelte die nach Pr und Futterentzug.

B: Die Enzymaktivitätsveränderungen sind in % der Hungerkontrollen angegeben.
a): 24 h nach α-HCH-Gabe Futterentzug, auf diesen Zeitpunkt beziehen sich die angegebenen Stundenwerte.
b): Pr und gleichzeitig Futterentzug (diese Werte entsprechen der gestichelten Kurve im oberen Diagramm).
c): Pr und gleichzeitig Futterentzug 24 h nach α-HCH.

gleich zu nur hungernden Tieren (Abb. 10 B, Kurve a). Ebenso wurden bei der kombinierten Vorbehandlung mit α-HCH, Praseodym und Futterentzug keine Unterschiede zu den Werten nach alleiniger Praseodymeinwirkung gefunden (Abb. 10 B, Kurven b und c).

4. Fruc-1,6-diphosphatase

Die Fruc-1,6-diphase zeigte nur geringe Veränderungen (Tabelle 6). 24 h nach der Praseodym-Injektion war kein Unterschied zu den Kontrolltieren zu sehen, nach 48 h und 72 h sanken die Aktivitäten gering um 21 % bzw. 33 % ab. Während bei den bisher genannten Enzymen (P-C, PEP-CK, Gluc-6-phase) die Enzymaktivitäten in der Leber unter Hungerbedingungen durchschnittlich auf das zwei- bis dreifache anstiegen, blieb sie bei der Fruc-1,6-diphase gleich. Dieser Befund stimmt mit den Angaben von WEBER (1963) überein.

Nach Vorbehandlung mit α-HCH wurden für dieses Enzym keine anderen Aktivitäten als in den vorangehenden Versuchen bestimmt.

5. Ph-Fruc-Aldolase, Glyceraldehydph-DH, Lactat-DH und Glycerinphosphat-DH

Bei den bisher untersuchten Enzymen wurde eine unterschiedlich ausgeprägte Abnahme der Aktivität unter Praseodym gefunden. Um abzugrenzen, ob es sich um einen selektiven Einfluß des Schwermetallions auf diese Enzyme oder lediglich um eine allgemeine katabole Wirkung auf den Zellstoffwechsel handelt, wurden andere Enzyme des intermediären Kohlenhydratstoffwechsels untersucht (Tabelle 7). Ph-Fruc-Ald, GAP-DH und LDH sind sowohl an der Glykolyse wie an der Gluconeogenese beteiligt, während die Glycerinph-DH ein Enzym des Glycerinphosphat-Cyclus ist. Bei diesen Enzymen konnte bis 48 h nach Praseodym-Gabe kein signifikanter Unterschied zu den entsprechenden Hungerkontrollen gefunden werden. Erst nach diesem Zeitpunkt fielen die

Vorbehandlung	0 h (gefütt. Kontr.)	24 h	48 h	72 h
Futterentzug	n = 10 84 ± 7	n = 5 90 ± 4	n = 5 91 ± 6	n = 5 86 ± 6
α-HCH + Futterentzug			n = 5 89 ± 6	n = 5 95 ± 12
Pr + Futterentzug		n = 5 87 ± 5	n = 5 72 ± 4	n = 5 57 ± 5
α-HCH, Pr + Futterentzug			n = 4 71 ± 4	n = 5 50 ± 8

Tabelle 6

Zeitlicher Verlauf der Aktivität der Fruc-1,6-diphase im Leberhyaloplasma nach Praseodym (3,0 mg/kg) und der kombinierten Vorbehandlung mit α-HCH und Praseodym. Praseodym wurde in diesen Versuchen 24 h nach der α-HCH-Gabe injiziert. Gleichzeitig wurde den Tieren das Futter entzogen. Nur mit α-HCH behandelten Tieren wurde ebenfalls nach 24 h das Futter entzogen. Auf diesen Zeitpunkt beziehen sich die angegebenen Stundenwerte. Die Enzymaktivität ist in mU/ mg Prot angegeben.

Enzym	Vorbehandlung	0 h (gefütt.Kontr.)	24 h		48 h		72 h	
ph Fruc-Ald	Futterentzug	n = 20	n=8	0,063±0,005	n=8	0,059±0,008	n=14	0,067±0,008
	Pr + Futterentzug	0,076 ± 0,008	n=8	0,063±0,004	n=8	0,058±0,006	n=10	0,040±0,006
GP-DH	Futterentzug	n = 15	n=8	0,82±0,08	n=8	0,86±0,10	n=14	0,82±0,09
	Pr + Futterentzug	0,90 ± 0,09	n=8	0,85±0,10	n=8	0.89±0,10	n=10	0,43±0,10
GAP-DH	Futterentzug	n = 10	n=8	2,1 ± 0,2	n=8	1,8 ± 0,2	n= 8	1,9 ± 0,2
	Pr + Futterentzug	2,2 ± 0,2	n=5	2,0 ± 0,1	n=8	2,0 ± 0,4	n= 6	1,9 ± 0,2
LDH	Futterentzug	n = 20	n=8	5,2 ± 0,4	n=8	5,6 ± 0,4	n=14	5,5 ± 0,5
	Pr + Futterentzug	5,4 ± 0,8	n=8	5,4 ± 0,5	n=8	5,4 ± 0,5	n=10	4,4 ± 0,8

Tabelle 7

Veränderungen der Enzymaktivitäten von ph-Fructaldolase, Glycerin-ph-DH, Glyceraldehydph-DH und Lactat-DH der Leber im Hunger sowie unter Praseodym (3,0 mg/kg) bei gleichzeitigem Futterentzug. Alle Werte sind in U/mg Prot angegeben. In den stark umrandeten Feldern sind die Werte untereinander signifikant verschieden ($p<0,001$).

Enzymaktivität von ph-Fruc-Ald, GP-DH und LDH unterschiedlich stark unter die Kontrollwerte ab. Die GAP-DH zeigte auch bis 72 h nach Beginn der Vorbehandlung keine Veränderungen.

6. Pyruvatkinase

Ein völlig anderes Verhalten zeigte die Pyruvatkinase unter Praseodymeinwirkung. Sie ist ein Schlüsselenzym der Glykolyse. Unter Hungerbedingungen nahm ihre spezifische Aktivität innerhalb von 72 h um etwa 50 % ab (Abbildung 11). Dieser Befund stimmt mit Ergebnissen anderer Autoren überein (z.B. WEBER et al. 1966, STÖRMER et al. 1970, TYRELL und ANDERSON 1971).

Nach Praseodymgabe und gleichzeitigem Futterentzug blieb dieser Aktivitätsabfall aus. Die gemessenen Werte lagen bis 48 h noch im Bereich gefütterter Kontrolltiere. Nach diesem Zeitpunkt kam es sogar zu einer Zunahme an Enzymaktivität mit einem Maximum nach etwa 72 h. Wurde den Tieren das Futter während der Vorbehandlungszeit belassen, war dieser Effekt noch stärker ausgeprägt (Abbildung 12). Um zu prüfen, ob es sich dabei um eine Zunahme an Enzymprotein handelte, wurde den Tieren 48 h nach Praseodymgabe Actinomycin D (500 µg/kg) intraperitoneal injiziert und die Enzymaktivität nach weiteren 24 h bestimmt. Actinomycin blockiert durch Komplexbildung mit der DNA die Transcription (REICH und GOLDBERG 1964, REICH 1964). Die relativ hohe Actinomycin-Dosis wurde deshalb gewählt, um innerhalb von 24 h einen maximalen Effekt zu erzielen. Ein orientierender Versuch hatte eine erhöhte Toxizität bei der kombinierten Behandlung mit Praseodym und Actinomycin ergeben. Auch bei niederer Dosierung (250 µg/kg zum Zeitpunkt der Praseodym-Gabe und weiteren 100 µg/kg) überlebten nur 15 % der Tiere 48 h nach Beginn der Vorbehandlung.

Unter diesen Versuchsbedingungen lag die Enzymaktivität der Pyruvatkinase bei den mit Praseodym und

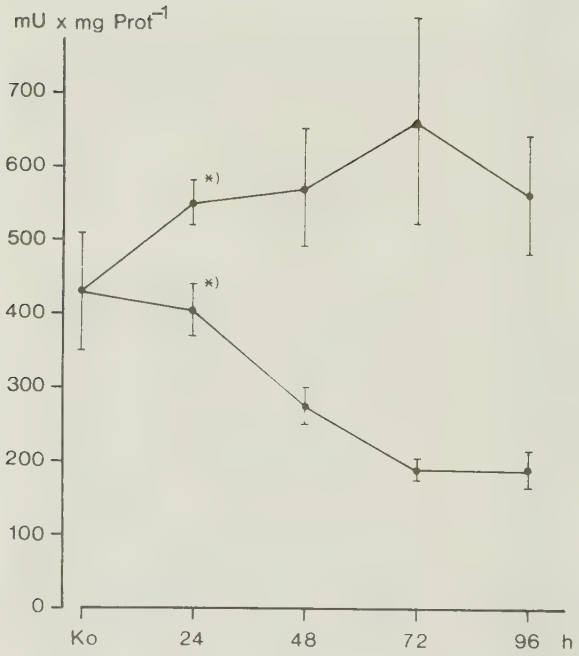


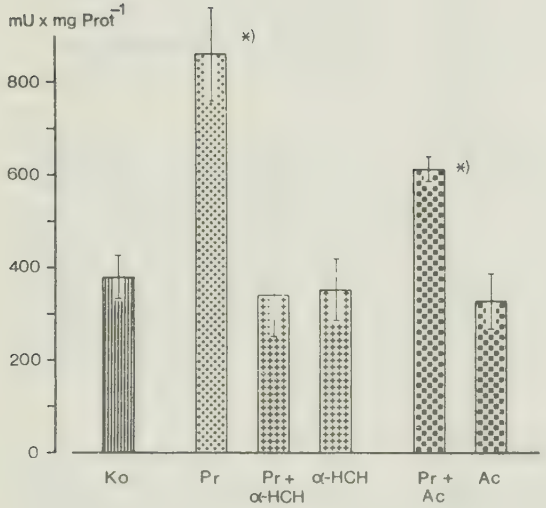
Abbildung 11

Zeitlicher Verlauf der Aktivität der Pyruvatkinase der Leber nach Praseodym (3 mg/kg)

obere Kurve: Pr + Futterentzug

untere Kurve: nur Futterentzug

*) - *): p 0,001



* - *: $p < 0{,}001$

Abbildung 12

Einfluß von α-HCH und Actinomycin auf die nach Praseodym (3 mg/kg) gesteigerte Aktivität der Pyruvatkinase der Leber (in allen Versuchen Futter ad lib.).

Ko:	gefütterte Kontrolltiere
Pr:	72 h nach Praseodymgabe
Pr + α-HCH:	24 h Vorbehandlung mit α-HCH (200 mg/kg) vor der Pr-Gabe; Zeitpunkt der Dekapitation 72 h nach Pr und 96 h nach α-HCH.
α-HCH:	96 h nach α-HCH
Pr + Ac:	48 h nach Pr Actinomycin 500 mg/kg i.p., Dekapitation nach weiteren 24 h.
Ac:	nur Actinomycin, 1 x 250 µg/kg, 24 h später weitere 100 µg/kg, Dekapitation 48 h nach Beginn der Vorbehandlung.

Actinomycin behandelten Tieren 72 h nach der Pr- Gabe signifikant niedriger als bei den nur mit Praseodym behandelten Tieren (Abbildung 12). Actinomycin selbst hatte über 48 h bei einer Gesamtdosis von 350 µg/kg (250 µg/kg und 100 µg/kg nach 0 h und 24 h) keinen Einfluß auf die Pyruvatkinase. Die Ergebnisse lassen den Schluß zu, daß es sich bei der beobachteten Aktivitätssteigerung unter Praseodym um eine Induktion handelt.

Bei der kombinierten Vorbehandlung mit α-HCH und Praseodym (α-HCH 24 h vor der Pr-Injektion) blieb der Aktivitätsanstieg aus. Unter diesen Bedingungen lagen die Meßwerte auch nach 72 h im Bereich der gefütterten Kontrollen. α-HCH selbst hatte nach 96 h keine Änderung der Aktivität der Pyruvatkinase zur Folge. Dies befindet sich in Übereinstimmung zu Befunden von KUNZ und SCHNIEDERS (1970) an Mäuselebern.

7. Ph-Fructokinase

Die ph-Fructokinase ist ein weiteres Schlüsselenzym der Glykolyse. Im Gegensatz zur Pyruvatkinase konnten hier keine Unterschiede über die Untersuchungszeit bis 72 h zu den Hungerkontrollen festgestellt werden (Tabelle 8) Unter den gewählten Versuchsbedingungen fiel im Gegensatz zu den Ergebnissen anderer Autoren (WEBER et al. 1966, SÖLING et al. 1971) die Aktivität dieses Enzyms nicht unter die Werte gefütterter Kontrollen. Andererseits werden in der Literatur über derartige Veränderungen von Enzymaktivitäten unterschiedliche Angaben mitgeteilt. SÖLING et al. (1971) finden zwar für die ph-Fructokinase nach 48 h Hunger einen Aktivtätsabfall von 50 %, aber keinen für die Pyruvatkinase. Auch der quantitative Unterschied des Aktivitätsabfalles im Hunger differiert zum Teil erheblich. WEBER et al. (1966) geben eine Verminderung der Aktivität der Pyruvatkinase nach 24 h von etwa 25 % an während STÖRMER et al. (1970) bei dem gleichen Enzym bereits nach 12 h Hunger einen Abfall von 70 % registrierten.

Vorbehandlung	0 h (gefütt.Kontr.)	24 h	48 h	72 h
Futterentzug	n = 12 26,9 ± 2,8	n=5 23,0±0,6	n=5 23,5±1,7	n=5 23,6±2,0
Pr, Futter ad lib.		n=5 25,8±0,7	n=5 28,5±1,8	n=5 23,3±1,2
Pr und gleichzeitig Futterentzug		n=4 26,6±0,9	n=5 26,3±1,5	n=5 26,9±2,5

Tabelle 8

Zeitlicher Verlauf der Aktivität der ph-Fructokinase im Leberhyaloplasma nach Praseodym (3,0 mg/kg). Die Enzymaktivität ist in mU/mg Prot angegeben.

Sicher wird ein Teil der voneinander abweichenden Ergebnisse der verschiedenen Autoren auf unterschiedlichen Versuchs-, Präparations- und Meßbedingungen beruhen, auf die besonderen Schwierigkeiten bei der Aktivitätsbestimmung der ph-Fructokinase war schon bei der Beschreibung der Methoden hingewiesen worden.

8. Glucose-6-phosphat-DH und 6-ph-Gluconat-DH

Glucose-6-ph-DH und 6-ph-Glucon-DH gelten als Schlüsselenzyme des oxydativen Teils des Pentosephosphatweges. Auch ihre Aktivitäten nahmen im Hunger ab (Abbildung 13 und Tabelle 9). Unter Praseodymeinwirkung wurden für die Gluc-6-ph-DH analoge Veränderungen wie bei der Pyruvatkinase gefunden. Bis 48 h nach der Pr-Injektion blieb die Enzymaktivität gleich, später kam es zu einer actinomycinempfindlichen Induktion mit einem Maximum nach 72 h (Abbildungen 13 und 14). Wie bei der Pyruvatkinase blieb diese Induktion nach einer 24stündigen Vorbehandlung mit α-HCH vor der Praseodyminjektion aus.

Analoge Befunde wurden kürzlich von ARVELA und KÄRKI (1972) mitgeteilt. Sie untersuchten die Gluc-6-ph-DH nach Gabe von Cer (2 mg/kg) und fanden ebenfalls einen Anstieg der Enzymaktivität nach 72 h, der durch eine Vorbehandlung mit Phenobarbital verhindert wurde. Phenobarbital führt wie α-HCH zu einer Verminderung der toxischen Leberveränderungen durch Seltene Erden (HOCHSTRATE und OBERDISSE 1970).

Auf die Aktivität der 6-ph-Gluconat-DH hatte Praseodym nur einen geringen Einfluß (Tabelle 9). Ihre Aktivität nahm unter Praseodym und Hunger im Verlauf mehrerer Tage gering ab, die Werte lagen aber durchweg höher als bei alleinigem Futterentzug. Eine Induktion wie bei der Gluc-6-ph-DH oder Pyruvatkinase konnte hier nicht beobachtet werden.

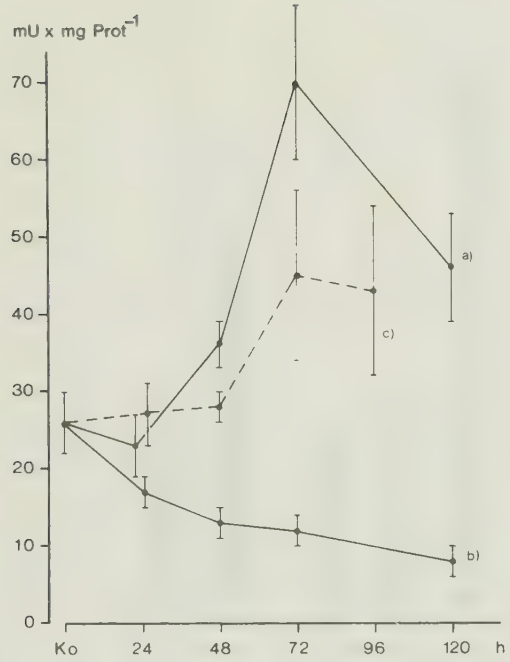


Abbildung 13

Zeitlicher Verlauf der Gluc-6-ph-DH der Leber nach Praseodym (3 mg/kg).

a): Praseodym und Futter ad libitum

b): nur Futterentzug

c): Praseodym und gleichzeitig Futterentzug

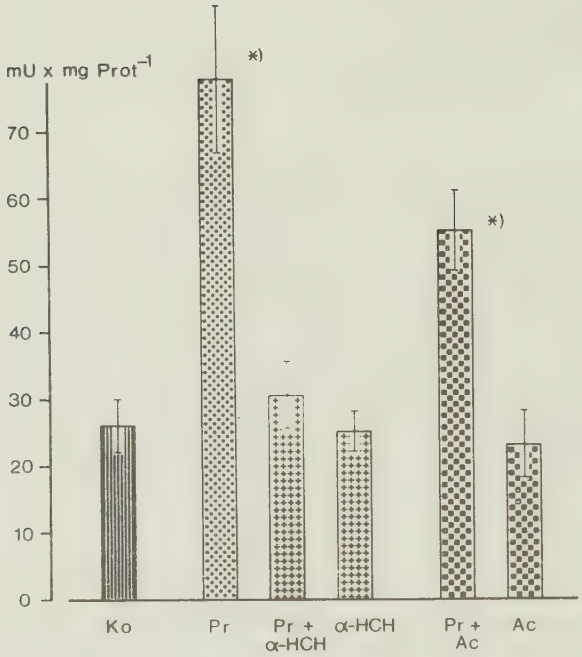


Abbildung 14

* - *: $p < 0{,}001$

Einfluß von α-HCH und Actinomycin auf die nach Praseodym (3 mg/kg) gesteigerte Aktivität der Gluc-6-ph-DH der Leber (in allen Versuchen Futter ad lib.).

Ko:	gefütterte Kontrolltiere
Pr:	72 h nach Praseodym-Gabe
Pr + α-HCH:	24 h Vorbehandlung mit α-HCH (200 mg/kg) vor der Pr-Gabe; Zeitpunkt der Dekapitation 72 h nach Pr und 96 h nach α-HCH.
α-HCH:	96 h nach α-HCH
Pr + Ac:	48 h nach Pr Actinomycin 500 µg/kg i.p., Dekapitation nach weiteren 24 h.
Ac:	nur Actinomycin, 1 x 250 µg/kg, 24 h später weitere 100 µg/kg, Dekapitation 48 h nach Beginn der Vorbehandlung

Vorbehandlung	0 h (gefütt.Kontr.)	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h
Pr, Futter ad libitum		n = 10 51 ± 6	n = 6 41 ± 3	n = 11 43 ± 6		n = 12 37 ± 5
Pr und gleichzeitig Futterentzug		n = 7 40 ± 8	n = 5 46 ± 8	n = 5 38 ± 4 *)	n = 4 36 ± 4	
Futterentzug	n = 23 48 ± 6	n = 6 38 ± 4	n = 6 34 ± 5	n = 6 29 ± 4		n = 4 24 ± 7
α-HCH, Pr, Futter ad libitum				n = 6 41 ± 8		
α-HCH, Futter ad libitum					n = 5 51 ± 6	

Tabelle 9

Zeitlicher Verlauf der 6-ph-Gluconat-DH im Leberhyaloplasma nach Praseodym (3,0 mg/kg) und der kombinierten Vorbehandlung mit α-HCH und Pr. Die Enzymaktivität ist in mU/ mg Prot angegeben. Pr wurde 24 h nach der α-HCH-Gabe (2oo mg/kg) injiziert, und die Tiere nach weiteren 72 h dekapitiert. *): $p < 0{,}005$

IV. Einfluß von Praseodym auf die durch Hunger induzierte Gluconeogenese

Die vorliegenden Befunde zeigen, daß Praseodym innerhalb von 24 h zu einer ausgeprägten Hemmung der hepatischen Gluconeogenese führt. In diesen Versuchen wurde den Tieren zum Zeitpunkt der Praseodym-Gabe das Futter entzogen und die Meßwerte mit denen hungernder Kontrollen verglichen. Der Futterentzug bewirkte bei den Kontrollen eine Steigerung der hepatischen Gluconeogenese, erkenntlich an der Induktion gluconeogenetischer Schlüsselenzyme und der Aktivitätsverminderung glucoseverbrauchender Reaktionen (Glykolyse, Pentosephosphatweg). Auch wenn man den mit Praseodym behandelten Tieren das Futter beließ, sank die Futteraufnahme nach eigenen Versuchen um 70 % innerhalb der ersten 24 h und um 90 % nach 48 h ab. Danach konnte nicht sicher entschieden werden, ob Praseodym nur einen hemmenden Effekt auf die durch Hunger ausgelöste Steigerung der Enzymaktivität hatte oder einen direkten Einfluß auf diese Enzyme ausübte. Da bereits nach 24 h Futterentzug eine maximale Steigerung der P-C, PEP-CK und Gluc-6-phase nachweisbar war, wurde in neuen Versuchen Praseodym erst zu diesem Z eitpunkt injiziert. Den Tieren wurde auch nach der Inkjektion weiterhin das Futter entzogen.

Diese Versuchsanordnung war auch deshalb gewählt worden, weil BAMANN et al. (1954 a + b) die Ansicht vertraten, daß die Seltenen Erden durch hydrolytische Spaltung vornehmlich der Hexosephosphatester des intermediären Kohlenhydratstoffwechsels einen abnormen Verbrauch von Glucose und Glykogen verursachen und dadurch zur Hypoglykämie führen. Nach einer 24 h Hungerperiode sind praktisch alle Kohlenhydratreserven der Tiere in Form von Glykogen erschöpft. Wird Praseodym erst zu diesem Zeitpunkt injiziert, wäre nach dieser Theorie eine Verstärkung der toxischen Erscheinungen zu erwarten. Über-

raschenderweise trat das Gegenteil ein. Ein Abfall der Glucosekonzentration im Blut ließ sich unter diesen Bedingungen nicht mehr nachweisen (Abbildung 6, Kurve c). Z umindest bis 48 h nach der Injektion fanden sich keine signifikanten Unterschiede zu den Blutzuckerwerten hungernder Kontrollen. Parallel dazu verminderte sich die Toxizität. Bis 96 h lebten noch ca. 70 % der Tiere, während bei dieser Dosis (4,5 mg/kg) ohne vorangehende Hungerperiode kein Tier 72 h nach der Injektion überlebte. Bei diesen war schon nach 24 h makroskopisch eine starke Verfettung der Leber sichtbar, bei jenen Tieren war die Leber dagegen 24 h nach der Injektion noch unverändert und erst nach 48 h leicht verfettet.

Die Aktivität der PEP-CK wurde aber auch in dieser Versuchsanordnung durch Praseodym unverändert gehemmt (Abbildung 15). Die Enzymaktivität wurde in dieser Abbildung im halblogarithmischen Maßstab über die Zeit aufgetragen. Kurve c dieser Abbildung entspricht Kurve c aus Abbildung 8 und zeigt, daß die Aktivität der PEP-CK nach der Praseodym-Gabe exponentiell mit einer Halbwertszeit von etwa 24 h abfällt. Die Geschwindigkeit des Abfalles war gleich groß, wenn den Tieren erst nach einer vorangehenden Hungerperiode Praseodym injiziert wurde. Da in diesem Fall der Ausgangswert (24 h Futterentzug) das dreifache der gefütterten Kontrollen betrug, lagen die absoluten Werte der Enzymaktivität auch um das drei- bis vierfache über den Werten von Tieren, die im gefütterten Zustand Praseodym erhielten, und entsprachen etwa denen gefütterter Kontrollen.

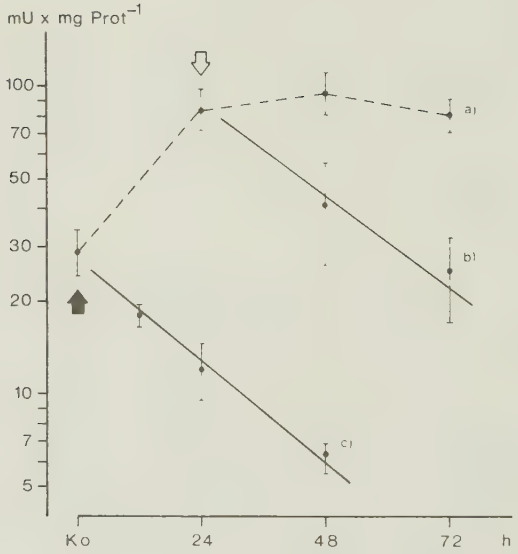


Abbildung 15

Einfluß von Praseodym (3,0 mg/kg) auf die Aktivität der PEP-CK im Leberhyaloplasma nach einer vorangegangenen 24stündigen Hungerperiode.

a): Futterentzug

b): nach 24 h Futterentzug Praseodym (⇩) und anschließend weiter Futterentzug

c): Futterentzug gleichzeitig mit der Pr-Gabe (⬆)

D Diskussion

Die Ergebnisse zeigen, daß der seit längerer Zeit bekannte Abfall der Glucosekonzentration im Blut nach intravenöser Injektion von Seltenen Erden auf einer Hemmung der hepatischen Gluconeogenese beruht. 24 h nach Praseodym-Gabe ist die Glucoseneubildung aus Pyruvat von Leberschnitten um 87 % gegenüber Hungerkontrollen vermindert. Das diesem Wert zu Grunde liegende Feuchtgewicht der Schnitte ist unter diesen Bedingungen an sich keine geeignete Bezugsgröße, da durch Verfettung und Wassereinlagerung des Organs im Zuge der dystrophischen Veränderungen zu niedrige Werte vorgetäuscht werden können. Nach eigenen orientierenden Versuchen über Wasser- und Proteingehalt der Leber nach Praseodymeinwirkung (ohne Befunddokumentation) ist zumindest bis 24 h der Unterschied nicht besonders ausgeprägt und die Hemmung der Gluconeogenese beträgt auch nach einer solchen Korrektur (bei Bezug auf den Proteingehalt der Leber) immer noch fast 80 %.

Die Ursache dieser Hemmung dürfte auf der verminderten Aktivität mehrerer gluconeogenetischer Schlüsselenzyme der Leber beruhen. In Abbildung 16 ist der zeitliche Verlauf der Aktivitäten aller in dieser Arbeit untersuchten Enzyme unter Praseodym-Einfluß zusammengefaßt. Die in der Versuchsanordnung „Praseodym und gleichzeitiger Futterentzug" gefundenen Enzymaktivitäten wurden in % der entsprechenden Hungerkontrollen über die Zeit aufgetragen. Der halblogarithmische Maßstab wurde gewählt, um sowohl eine Zu- wie Abnahme von Enzymaktivität in der gleichen Größenordnung wiederzugeben. Ferner ist in der Abbildung ein Bereich von ± 20 % abgegrenzt. Unterschiede um diesen Betrag haben bei derartigen Untersuchungen nur geringe Aussagekraft und wurden nicht berücksichtigt.

Diese Abbildung zeigt deutlich den frühzeitigen Abfall der gluconeogenetischen Schlüsselenzyme PEP-CK,

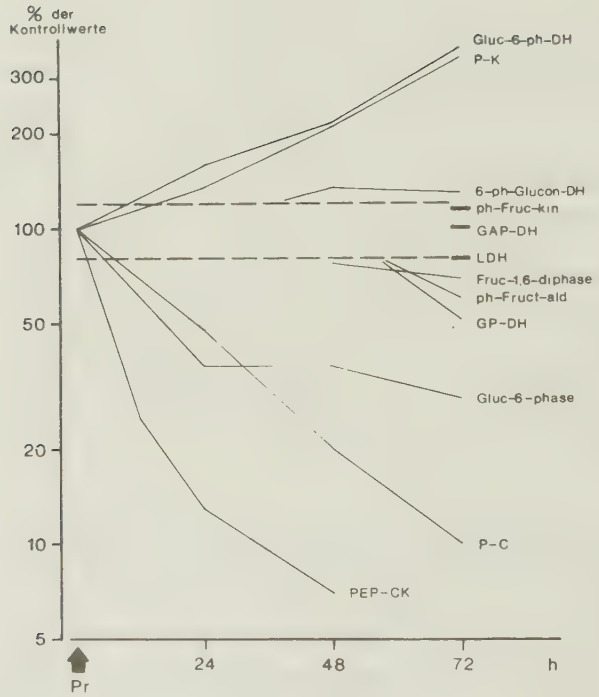


Abbildung 16

Zusammenfassende Darstellung der in dieser Arbeit untersuchten Enzymaktivitäten unter dem Einfluß von Praseodym (3,0 mg/kg) und gleichzeitigem Futterentzug. Die Enzymaktivitäten sind in % der entsprechenden Hungerkontrollen(= 100 %) aufgetragen. Die gestrichelten Linien umgrenzen einen Bereich von 100 ± 20 %. Veränderungen innerhalb dieses Bereichs sind zur besseren Übersichtlichkeit nicht eingezeichnet. Die ph-Fructokinase, GAP-DH und LDH zeigten während der Untersuchungszeit keine größeren Änderungen als ± 20 % und sind durch die kurzen dicken Striche gekennzeichnet.

P-C und Gluc-6-phase, während andere Enzyme, die sowohl an der Glykolyse wie Gluconeogenese beteiligt sind, erst wesentlich später und im Vergleich zu ersteren nur geringfügige Veränderungen aufweisen. Eine uniforme katabole Wirkung auf den Zellstoffwechsel ist danach unwahrscheinlich. Erst die späteren Veränderungen nach 48 h können sekundär im Zuge der mittlerweile ausgeprägten Leberdystrophie bedingt sein. Die Selektivität der Seltenen Erden auf einzelne Enzyme unterstreicht das Verhalten von Pyruvatkinase und Gluc-6-ph-DH, deren Aktivitäten nach Praseodym-Gabe kontinuierlich zunehmen. Bis 48 h beruht dieser Anstieg auf der im Vergleich zu den gefütterten Kontrollen gleichbleibenden Enzymaktivität, während sie bei den Hungerkontrollen absinkt. Erst nach diesem Zeitpunkt kommt es zu einer Zunahme an Enzymprotein, die mit Actinomycin D teilweise unterdrückt werden kann.

Von allen untersuchten Enzymen zeigt die PEP-CK die größten Veränderungen. Die ausgeprägte Hemmung dieses Enzyms dürfte der entscheidende Faktor für die Entstehung der Hypoglykämie sein. Die Abnahme der Aktivität der PEP-CK korreliert gut mit der verminderten Glucoseproduktion der Leberschnitte. In beiden Fällen beträgt die Restaktivität zwischen 15 % und 20 % 24 h nach der Praseodym-Injektion.

Die Hemmung der Gluconeogenese durch Praseodym ist auf die Leber beschränkt. Messungen der Glucoseneubildung aus Pyruvat von Nierenrindenschnitten zeigen auch nach 48 h keinen Unterschied zu Kontrollen. Dieser Umstand kann durch die Verteilung der Seltenen Erden im Organismus bedingt sein. LAZLO et al. (1952), MAGNUSSON (1963) und SCHMAUTZ (1964) zeigten, daß die Lanthanide bevorzugt in den Organen des Reticuloendothelialen Systems gespeichert werden (Leber, Milz und Knochenmark). Während der von der Leber aufgenommene Anteil einer applizierten Dosis mehr als 50 % betrug, fanden die Autoren in den Nieren weniger als 1 %. Möglicherweise reicht die intrazelluläre Konzentration der Seltenen Erden in der Niere nicht aus, um eine Hemmung der Gluconeogenese herbeizuführen.

Sofern die in vitro gefundene Hemmung der Leber-Gluconeogenese durch Praseodym auch für in vivo-Verhältnisse zutrifft, muß die Frage diskutiert werden, ob die verbleibende Gluconeogeneserate zur Glucoseversorgung der Tiere überhaupt ausreichen kann. Die Versuche wurden unter Hungerbedingungen durchgeführt und man kann davon ausgehen, daß schon nach 24 h alle Kohlenhydratreserven in Form von Glykogen verbraucht sind. Spätestens von diesem Zeitpunkt an muß der Glucoseverbrauch von der endogenen Gluconeogenese gedeckt werden. Eine kurze Überschlagsrechnung soll die Bedeutung der Gluconeogenese für den Organismus unter diesen Bedingungen verdeutlichen:

Der Mindestglucosebedarf der Tiere entspricht dem Glucoseverbrauch des Gehirns. Abgesehen von den Erythrozyten, die ebenfalls ausschließlich auf Glucose angewiesen sind (keine Mitochondrien), können andere Organe - im wesentlichen die Muskulatur - ihren Energiebedarf vollständig aus der Verbrennung von Fettsäuren und Ketonkörpern decken (GARLAND et al. 1962). In der Literatur finden sich Angaben für den Glucoseverbrauch des Rattengehirns von etwa 1 mmol/kg FG x min (KETY 1957, GAITONDE und RICHTER 1966). Das Gehirngewicht von 130 g schweren Ratten beträgt ca. 1,8 g. Somit werden allein vom Gehirn in 24 h 2,6 mmol Glucose verbraucht. Der in der extrazellulären Flüssigkeit (20 % des Körpergewichtes) enthaltene Glucosegehalt beträgt bei den Kontrollen nach 24 h Hunger (ca. 80 mg% Glucosekonz. im Blut, resp. 4,4 mmol/l) etwa 0,11 mmol (4,4 x 0,2 x 0,13). Die Glucosemenge der extrazellulären Flüssigkeit wird also innerhalb von 24 h mindestens 23 mal (2,6 : 0,11) vollständig umgesetzt. Bei völligem Ausfall der endogenen Gluconeogenese aber würde die in der extrazellulären Flüssigkeit vorhandene Glucose in spätestens 1 h verbraucht sein.

Wenn die in dieser Arbeit gefundenen Meßwerte für die Hemmung der hepatischen Gluconeogenese von 80 % nach 24 h richtig sind, so muß eine erhebliche Einschränkung des Glucoseverbrauchs der Tiere gefordert werden. Tatsächlich fand RÖHLING eine verminderte Glucoseutilisation - gemessen im Glucosetoleranztest und

an der $14-CO_2$-Exhalation nach intravenöser Gabe von 14-C-Glucose - um etwa 60 % 48 h nach Praseodym-Gabe. Unter diesen Gesichtspunkten wären zur Aufrechterhaltung der Glucosehomoiostase nur noch 40 % der normalen Glucoseneubildung erforderlich. Davon können offenbar 20 % noch von der Leber geliefert werden, zur Deckung der restlichen 20 % reicht die Gluconeogeneserate der Nieren ohne weiteres aus. Sie verläuft auch unter Praseodym ungestört und beträgt - auf Grund des geringeren Gewichts beider Nieren - etwa 1/5 der normalen Gesamtgluconeogenese (zitiert nach SEUBERT 1969). Nach dieser orientierenden Rechnung erscheint eine Einschränkung der hepatischen Gluconeogenese um 80 % auch in vivo ohne weiteres möglich und das Absinken der Glucosekonzentration im Blut muß als Ausdruck der nicht völlig ausgeglichenen Bilanz zwischen Glucosebedarf und Glucoseneubildung der Tiere angesehen werden.

Zur Differenzierung der Frage, ob Praseodym nur die durch Hunger ausgelöste Induktion der Gluconeogenese hemmt oder einen direkten Angriff auf die gluconeogenetischen Schlüsselenzyme besitzt, wurde Praseodym nach einer vorangehenden 24stündigen Hungerperiode injiziert. Dabei zeigte sich überraschend, daß sich die Blutzuckerwerte zumindest bis 48 h nicht mehr signifikant von denen gleich lang hungernder Kontrollen unterschieden. Das kann zum Teil durch das Verhalten der PEP-CK erklärt werden. Durch die 24stündige Hungerperiode wurde das Enzym induziert und die Enzymaktivität stieg um fast das doppelte an. Auch unter diesen Bedingungen wird die PEP-CK durch Praseodym unverändert gehemmt, jedoch liegen die absoluten Werte der Enzymaktivität auf Grund des hohen Ausgangswertes wesentlich höher als bei den Tieren, die im gefütterten Zustand Praseodym erhielten und bewegen sich im Bereich gefütterter Kontrolltiere. Der Einfluß von Praseodym auf die PEP-CK ist also unabhängig von der Stoffwechsellage der Tiere. Unter diesen Versuchsbedingungen resultiert bei zwar immer noch verminderter, aber relativ höherer Aktivität der PEP-CK auch eine höhere

gluconeogenetische Aktivität der Leber. Das zwar immer noch bestehende, jetzt aber geringere Defizit der hepatischen Gluconeogenese kann, wahrscheinlich durch Beschränkung des peripheren Glucoseverbrauchs, besser kompensiert werden, so daß die Glucosekonzentration im Blut konstant gehalten werden kann und nicht über das hungerbedingte Ausmaß abfällt.

In den letzteren Versuchen war nicht nur die Wirkung des Praseodym auf den Blutzucker aufgehoben, es zeigte sich auch eine Verminderung der Toxizität und der Leberverfettung. Die hier nur makroskopisch beurteilte geringere Leberverfettung wurde von GRAJEWSKI durch quantitative Bestimmung des Fettgehaltes der Leber bestätigt. Danach ergibt sich die Frage, ob ein Zusammenhang zwischen der Hypoglykämie und der Leberverfettung besteht, insbesondere deshalb, da bei den mit Seltenen Erden vorbehandelten Tieren auch eine gesteigerte Lipolyse, gemessen am Anstieg der Freien Fettsäuren im Serum, nachweisbar ist (SNYDER und STEPHENS 1961) und nach Ansicht dieser Autoren die Hypoglykämie der gesteigerten Lipolyse zeitlich vorausgeht.

Im Fettgewebe fehlt das Enzym Glycerokinase (WIELAND und SUYTER 1957). Die Lipogenese hängt deshalb von einer ausreichenden Glucosezufuhr ab, da hier das zur Triglyceridsynthese norwendige Glycerinphosphat nur über die Phosphorylierung von Glucose erhalten werden kann. Bei Absinken der Glucosekonzentration im Blut oder wie im Diabetes mellitus bei verminderter Aufnahme von Glucose durch den Mangel an Insulin sinkt in den Fettzellen die Glycerinphosphatproduktion, die ihrerseits eine verminderte Triglyceridsynthese nach sich zieht. Da im Fettgewebe gleichzeitig Lipolyse und Lipogenese ablaufen, überwiegt in diesem Fall die Lipolyse und es kommt zu einem Anstieg der Freien Fettsäuren im Serum. Nach Beobachtungen von FEIGELSON et al. (1961) kann bereits ein übermäßiges Angebot an Freien Fettsäuren zu einer Leberverfettung führen.

Ob der Abfall der Glucosekonzentration im Blut nach Gabe von Seltenen Erden der einzige auslösende Faktor für den Anstieg der Freien Fettsäuren ist, bedarf weiterer Abklärung. Auch wenn enge Beziehungen zwischen Hypoglykämie, Lipolyse im Fettgewebe und Fetteinlagerung in der Leber bestehen mögen, werden sie sicher nur ein Teil in dem komplexen Pathomechanismus sein. Dies zeigen die Versuche mit der kombinierten Behandlung von α-HCH und Praseodym. Die Vorbehandlung der Tiere mit α-HCH hatte analog zu Befunden von RÖHLING über die Blutglucosekonzentration keinen oder nur einen geringen Einfluß auf die Hemmung der Glucoseproduktion von Leberschnitten und der Aktivitäten der gluconeogenetischen Schlüsselenzyme, insbesondere der PEP-CK, während die Unterschiede hinsichtlich der Toxizität (OBERDISSE 1970 a) und der Leberverfettung (GRAJEWSKI) in der gleichen Versuchsanordnung wesentlich stärker ausgeprägt sind. Daher muß ein weiterer Angriffspunkt der Seltenen Erden im Fettstoffwechsel der Leber selbst gesucht werden. Nach Untersuchungen von RECKNAGEL et al. (1960) sowie von LOMBARDI und RECKNAGEL (1962) wird die Fettakkumulation in der Leber bei einer Reihe hepatotoxischer Substanzen wie CCl_4, Äthionin und Phosphor auf eine Störung in der Synthese der Lipoproteine in der Leber, deren Kopplung mit Triglyceriden oder deren Sekretion in das Blut zurückgeführt. Nach den Ergebnissen dieser Autoren soll der gleiche Pathomechanismus auch für die Leberverfettung nach Seltenen Erden zutreffen.

Wie aus der Literatur bekannt ist, existieren für die Seltenen Erden hinsichtlich Toxizität und Leberverfettung erhebliche geschlechtsspezifische Unterschiede (SNYDER et al. 1959, BRUCE et al. 1963). Weibliche Tiere reagieren empfindlicher als männliche Tiere. Nach BRUCE et al. (1963) sind für die gleiche Toxizität bei männlichen Ratten etwa 10fach höhere Dosen notwendig als bei Weibchen. Analoge Verhältnisse gelten nach den Befunden dieser Arbeit auch für den Kohlenhydratstoffwechsel. Während mit der üblichen Dosis (3 mg/kg) bei weiblichen Ratten eine ausgeprägte Hypoglykämie und eine starke Hemmung der PEP-CK der Leber

auftreten, sind bei der gleichen Dosis bei männlichen Tieren nur geringe Unterschiede in der Glucosekonzentration im Blut und der Aktivität der PEP-CK der Leber nachweisbar. Auf die möglicherweise hormonabhängige Wirkung der Seltenen Erden muß auch das gleichartige Verhalten dieser beiden Parameter nach Injektion von Praseodym bei juvenilen weiblichen Ratten und geschlechtsreifen weiblichen Ratten zurückgeführt werden.

Die bestehenden Unterschiede könnten zum Teil auf einer verschieden starken Anreicherung der Seltenen Erden in der Leber beruhen. Untersuchungen von SCHMAUTZ (1964) mit 144-Cer zeigten, daß die Lebern männlicher Tiere etwa 30 % der Dosis weniger aufnehmen als die weiblicher Ratten. Der 144-Cer-Gehalt der Leber war ferner abhängig vom Alter der Tiere und erhöhte sich bei männlichen Tieren durch Kastration und Zufuhr von Östrogenen beziehungsweise wurde durch Ovarektomie und Gabe von Testosteron bei weiblichen Tieren kleiner. Die Unterschiede sind jedoch zu gering, um die Geschlechtsspezifität der Seltenen Erden ausreichend zu erklären. Die eigenen Versuche zeigten auch, daß eine Änderung der Praseodym-Dosis von 3 mg/kg um $\pm$ 30 % bei weiblichen Ratten keinen signifikanten Einfluß auf den Blutzuckerabfall und die Hemmung der PEP-CK hatte.

Die in dieser Arbeit beobachteten Veränderungen im Kohlenhydratstoffwechsel konnten nur nach Vorbehandlung der Tiere durch intravenöse Injektion von Praseodym erzielt werden. Die Seltenen Erden werden nicht bei oraler und auch nicht bei subkutaner, intramuskulärer oder intraperitonealer Gabe resorbiert (BRUCE et al. 1963). Der in vitro-Zusatz von Praseodym hatte keinen Einfluß auf die Glucoseproduktion der Leberschnitte. Wahrscheinlich werden während der Inkubationszeit keine ausreichenden intrazellulären Konzentrationen des Schwermetallions erreicht. Auch der Zusatz von Praseodym in 10^{-4} M zum Testansatz der PEP-CK hatte keine Änderung der Enzymaktivität zur Folge. Damit ist ein allosterischer Effekt auf dieses

Enzym unwahrscheinlich. Es besteht auch eine auffällige Diskrepanz zwischen dem Zeitpunkt maximaler Konzentration der Seltenen Erden in der Leber, die bereits zwei Stunden nach der Injektion erreicht wird (SCHMAUTZ 1964), und den ersten biochemischen Veränderungen - Hypoglykämie -, die frühestens nach 12 h nachweisbar werden (SNYDER und STEPHENS 1961). Die Synthese spezifischer Hemmstoffe ist unwahrscheinlich, da die Aktivität der PEP-CK bei Inkubation kombinierter Leberhyaloplasmata (hungernde Kontrollen und mit Praseodym vorbehandelte Tiere) der Summe der getrennt bestimmten Hyaloplasmata entsprach. Es ist daher naheliegend, den Angriffspunkt der Seltenen Erden an der Enzymsynthese oder an den ihr vorgeschalteten Reaktionen im Nukleinsäurestoffwechsel zu suchen.

Die Abbildung 16 zeigt, daß frühzeitig nach der Gabe von Praseodym nur die Aktivitäten der gluconeogenetischen Schlüsselenzyme absinken, während andere Enzyme des Kohlenhydratstoffwechsels, die sowohl Glykolyse als auch Gluconeogenese beeinflussen, erst nach 48 h geringe Veränderungen zeigen. Schlüsselenzyme der Glykolyse (Pyruvatkinase) und des Pentosephosphatweges (Gluc-6-ph-DH) weisen dagegen eine ausgeprägte Aktivitätszunahme im Vergleich zu den Hungerkontrollen auf. Diese Selektivität der Seltenen Erden auf „one-way"-Reaktionen des Kohlenhydratstoffwechsels könnte die Ansicht von WEBER et al. (1966) untersützen, daß für Gluconeogenese und Glykolyse verschiedene Gene existieren, die dann eine unterschiedliche Empfindlichkeit gegenüber den Seltenen Erden besitzen würden. Dies setzt voraus, daß das Nukleinsäuresystem ein möglicher Angriffspunkt der Lanthanide ist. Es ist seit längerer Zeit bekannt, daß Seltene Erden Komplexe und schwerlösliche Salze mit der DNA bilden (HAMMARSTEN et al. 1928, CASPERSSON et al. 1935). Diese Eigenschaft wurde zeitweilig zur Fällung, Reinigung und Isolierung von Nukleinsäuren ausgenutzt (DAVIDSON und MAYMOUTH 1944). Befunde von OBERDISSE et al. (1973 b) zeigen, daß die RNA-Synthese, gemessen an der Aktivität der RNA-Polymerasen nach WIDNELL und TATA (1966) in

isolierten Leberzellkernen um etwa 75 % nach Vorbehandlung mit Praseodym absinkt. Die dosisabhängige Hemmung der RNA-Polymerasen zeigte eine auffällige Ähnlichkeit zu der unter gleichen Bedingungen gemessenen Aktivitätsminderung der PEP-CK. Ähnliche Befunde wurden von NOVELLO und STIRPE (1969) mitgeteilt, die eine Hemmung der RNA-Polymerasereaktion nach in vitro-Zusatz von Seltenen Erden beobachteten. Auf Grund der dazu benötigten hohen Ionenkonzentrationen könnte es sich dabei aber auch nur um unspefische Schwermetallioneneffekte gehandelt haben. Zur Zeit kann noch nicht sicher entschieden werden, ob der Hemmung der RNA-Synthese ein Einfluß der Lanthanide auf die Matritze (DNA), ähnlich der Wirkung des Actinomycins, oder auf das Polymerase-Enzym zu Grunde liegt. Zusätzlich und wahrscheinlich als Folge der gestörten RNA-Synthese wurde auch eine Hemmung der Proteinsynthese nach Praseodym gefunden (OBERDISSE et al. 1973 b).

Die Aktivitätsabnahme der gluconeogenetischen Schlüsselenzyme kann danach auf eine verminderte Neusynthese von Enzymprotein zurückgeführt werden. Der quantitativ unterschiedlich starke Abfall der einzelnen Enzyme könnte zum Teil auf den verschiedenen Halbwertszeiten beruhen. Auch die Instabilität der subzellulären Paritkel, an die diese Enzyme zum Teil gebunden sind (P-C, Gluc-6-phase), und die nach elektronenmikroskopischen Untersuchungen unter der Einwirkung der Seltenen Erden ausgeprägte Destuktionen zeigen (MAGNUSSON 1963), mag dabei eine Rolle spielen.

Für die starke Abnahme der PEP-CK kann noch ein anderer Faktor bedeutsam sein. Die Stabilität dieses Enzyms scheint kalziumabhängig zu sein. ROOBOL und ALLEYNE (1972) beschrieben eine spezifische Abnahme der PEP-CK Aktivität von Leberschnitten, die in kalziumfreien Medien inkubiert waren. Andererseits werden seit einigen Jahren Lanthansalze benutzt, um kalziumabhängige Effekte an Nerven- und Muskelmembranen zu blockieren (WEISS und GOODMANN 1969, MILEDI 1971). Offenbar besteht ein Antagonismus zwischen den Seltenen Erden und dem Kalzium. Analog dazu wurde von MELA (1969) eine Hemmung der Kalzium- und Magnesiumaufnahme von Rattenlebermitochondrien in vitro durch Lanthan mitgeteilt. Möglicherweise beruht

ein Teil der toxischen Wirkungen der Seltenen Erden in der Leber auch auf der Verdrängung des Kalziums von spezifischen Bindungsorten innerhalb der Zelle oder Zellkompartimente. Nähere Angaben über einen solchen Pathomechanismus sind heute jedoch noch nicht möglich.

Die Schlüsselenzyme der Gluconeogenese einerseits sowie der Glykolyse und des Pentosephosphatweges andererseits zeigen unter verschiedenen Fütterungsbedingungen gegensinniges Verhalten: Zunahme beziehungsweise Abnahme im Hunger und Abnahme/Zunahme bei Wiederfütterung der Tiere (WEBER 1963, WEBER et al. 1965). Da die Aktivitäten der gluconeogenetischen Schlüsselenzyme in der Leber unter Praseodym abnehmen, könnte die beobachtete Aktivierung der Schlüsselenzyme glucoseverbrauchender Reaktionen (P-K, Gluc-6-ph-DH) unter Praseodym auf einen solchen auf der Genebene lokalisierten Antagonismus zurückgeführt werden. Dagegen sprechen aber die Versuche der kombinierten Behandlung mit α-HCH und Praseodym. Nach Vorbehandlung der Tiere mit α-HCH ist der Einfluß von Praseodym auf die gluconeogenetischen Schlüsselenzyme unverändert, während der Aktivitätsanstieg von P-K und Gluc-6-ph-DH ausbleibt. α-HCH selbst hatte keinen Einfluß auf diese Enzyme.

Zumindest für die Gluc-6-ph-DH gibt es eine andere Erklärungsmöglichkeit. Die schon frühzeitig histologisch nachweisbaren Zellnekrosen nach Gabe von Seltenen Erden lösen – wie auch bei anderen lebertoxischen Substanzen, z.B. CCl_4 – eine lebhafte Regeneration aus, die nach Abklingen der toxisch-entzündlichen Veränderungen zu einer Restitutio ad integrum des Organs führen. Dabei spielt der Pentosephosphatweg eine wichtige Rolle in der Bereitstellung von Ribose-5-ph zur Neubildung der Nukleotide, die bei der Synthese von DNA und RNA in erhöhtem Maße benötigt werden. Die Induktion der Gluc-6-ph-DH wäre demnach Ausdruck der gesteigerten Nukleinsäuresynthese der regenerierenden Leberepithelzellen. Ähnliche Befunde wurden von HERKEN et al. (1970) an der regenerierenden Niere nach Gaben hoher Dosen Folsäure erhoben. Folsäure führt nach einer Schädigung der Tubulusepithelien

zu einem überschießendem Wachstum der Nieren mit entsprechender Zunahme des Stickstoff- und DNA-Gehaltes (THRELLFALL und TAYLOR 1969, BRADE et. al. 1970), einer Induktion der Enzyme der Pyrimidinbiosynthese (OBERDISSE und SCHURIG 1971) und der Schlüsselenzyme des Pentosephosphatweges (HERKEN et al. 1970). Auch an schnell wachsenden Tumoren, wie z.B. dem NOVIKOFF-Hepatom, wiesen WEBER und CANTERO (1957) eine erhöhte Aktivität der Gluc-6-ph-Dehydrogenase nach.

Die Pyruvatkinase zeigte unter dem Einfluß von Praseodym ein analoges Verhalten wie die Gluc-6-ph-DH. Eine direkte Beziehung zur Nukleinsäuresynthese besteht bei diesem Enzym nicht, jedoch wird bei der Pyruvatkinasereaktion ATP gebildet, das zur Phosphorylierung der Nukleoside benötigt wird, die erst als Triphosphate in die DNA und RNA eingebaut werden. WEBER (1968) beschrieb eine allosterische Hemmung der Pyruvatkinase durch verschiedene Nukleosidtriphosphate, wobei sich das Thymidintriphosphat als besonders starker Hemmstoff herausstellte. Nach neueren Untersuchungen scheint dem Thymidintriphosphat eine bedeutsame Rolle in der Kontrolle der Nukleinsäuresynthese zuzukommen. Nach Ansicht von WEBER (1968) erstreckt sich der Einfluß des TTP auch auf die Glykolyse und sieht als möglichen Angriffspunkt der Regulation die Pyruvatkinase an. Die bei vielen Tumoren nachweisbare erhöhte Glykolyserate könnte möglicherweise über einen solchen Mechanismus auf der hohen Wachstumsrate dieser Gewebe beruhen.

Die Aktivitätssteigerung von Gluc-6-ph-DH und Pyruvatkinase mit einem Maximum bei etwa 72 h nach Praseodym-Injektion können als Ausdruck der gesteigerten Nukleinsäuresynthese im Zuge der nach der Organschädigung auftretenden Leberregeneration angesehen werden und sind nicht auf eine direkte Wirkung der Seltenen Erden auf diese Enzyme zu beziehen. Auf der anderen Seite muß aber erwähnt werden, daß auch α-HCH im Zuge eines physiologischen Wachstums zu einer Leberzellvermehrung und damit zu einer gesteigerten DNA-Neubildung führt (SCHLICHT et al. 1968, OBERDISSE 1970 b), ohne daß es, wie die Befunde

dieser Arbeit und die Ergebnisse anderer Autoren (KUNZ und SCHNIEDERS 1970) zeigen, zu einer Induktion von Enzymen des Pentosephosphatweges kommt. Offenbar besitzt die Zelle verschiedene Regulationsmöglichkeiten bei physiologischem Wachstum einerseits und regenerativem Wachstum andererseits.

Auf die Aktivitätsverminderung der gluconeogenetischen Schlüsslenzyme durch Praseodym hatte α-HCH keinen Einfluß. Dagegen blieb bei Vorbehandlung der Tiere mit dieser Substanz die nach Praseodym auftretende Aktivitätssteigerung von Pyruvatkinase und Gluc-6-ph-DH aus. Dies kann folgendermaßen erklärt werden: Die Vorbehandlung mit α-HCH allein hat keinen Einfluß auf die Aktivitäten dieser Enzyme. Dagegen sind bei der kombinierten Behandlung mit α-HCH und Praseodym die dystrophischen Veränderungen der Leber und das Ausmaß der Zellnekrosen wesentlich geringer als bei alleiniger Praseodymeinwirkung. Daher fehlen in dieser Versuchsanordnung die reaktiven Regenerationsvorgänge oder sind nur gering ausgeprägt, die hier als Reiz zur Induktion von Pyruvatkinase und Gluc-6-ph-DH angesehen werden.

E Zusammenfassung

Nach intravenöser Injektion von Praseodym-Nitrat entsteht bei weiblichen Ratten neben einer Leberverfettung eine ausgeprägte und über mehrere Tage anhaltende Hypoglykämie, die auf eine Hemmung der hepatischen Gluconeogenese zurückgeführt wird. Die Glucoseproduktion aus Pyruvat von Leberschnitten war bereits nach 24 h um ca. 80 % vermindert. Die unter gleichen Bedingungen gemessene renale Gluconeogenese zeigte dagegen nach 48 h keine Unterschiede zu den Kontrollen. Die Hemmung der hepatischen Gluconeogenese wird auf eine Aktivitätsverminderung der gluconeogenetischen Schlüsselenzyme (P-C, PEP-CK, Fruc-1,6-diphase und Gluc-6-phase) zurückgeführt. Unter ihnen zeigte die PEP-CK eine besonders ausgeprägte Aktivitätsabnahme und sie dürfte der entscheidende Faktor für die Entstehung der Hypoglykämie sein. Andere Enzyme, die sowohl an der Glykolyse wie Gluconeogenese beteiligt sind (Fruc-1,6-diph-ald, GAP-DH, LDH und GP-DH) zeigten keine oder nur geringe Veränderungen. Eine uniforme katabole Wirkung auf den Zellstoffwechsel ist daher unwahrscheinlich. Eine Hemmung der PEP-CK konnte nur nach Vorbehandlung der Tiere erreicht werden, ein allosterischer Effekt des Schwermetallions auf dieses Enzym oder die in vivo-Synthese von Hemmstoffen konnten ausgeschlossen werden. Als möglicher Angriffspunkt der Seltenen Erden werden die der Enzymsynthese vorgeschalteten Reaktionen im Nukleinsäurestoffwechsel angesehen.

Wurde Praseodym erst nach einer vorangegangenen 24 stündigen Hungerperiode injiziert, sank anschließend die Glucosekonzentration nicht mehr unter die Werte der Kontrollen ab. Die Hemmung der PEP-CK war dagegen unverändert nachweisbar, jedoch lagen die absoluten Werte der Enzymaktivität auf Grund der durch Hunger ausgelösten Induktion des Enzyms vor der Praseodym-Gabe wesentlich höher als in den anderen Versuchen. Auf diesen Umstand wird das Ausbleiben der Hypoglykämie in dieser Versuchsanordnung zurückgeführt. Parallel dazu wurde eine sichtbar geringere Leberverfettung und eine Verminderung der Toxizität beobachtet.

Die aus der Literatur bekannte geschlechtsspezifische Wirkung Seltener Erden hinsichtlich Toxizität und Leberverfettung konnte auch für die Verhältnisse im Kohlenhydratstoffwechsel (Glucosekonzentration im Blut und Aktivität der PEP-CK) nachgewiesen werden. Darüberhinaus erwiesen sich nicht nur männliche Ratten weniger empfindlich, auch weibliche juvenile Ratten zeigten einen deutlich geringeren Abfall von Glucosekonzentration im Blut und Aktivität der PEP-CK der Leber gegenüber älteren weiblichen Tieren.

Während es nach intravenöser Injektion von Praseodym frühzeitig zu einer Aktivitätsabnahme der gluconeogenetischen Schlüsselenzyme kam, wiesen Schlüsselenzyme der Glykolyse (Pyruvatkinase) und des oxydativen Teils des Pentosephosphatweges (Glucose-6-ph-DH) zu einem späteren Zeitpunkt eine actinomycinempfindliche Aktivitätszunahme (Induktion) mit einem Maximum nach etwa 72 h auf. Als Ursache werden Regenerationsvorgänge angesehen, die durch die vorausgegangenen Zellschädigungen im Zuge der durch Praseodym bedingten Leberdystrophie ausgelöst wurden. Das Ausbleiben der Induktion dieser Enzyme nach Vorbehandlung der Tiere mit α-HCH vor der Praseodym-Injektion wird darauf zurückgeführt, daß bei dieser kombinierten Behandlung das Ausmaß der Zellnekrosen wesentlich geringer ist und eine ausgeprägte regenerative Zellneubildung als Reiz für die Induktion fehlt. Auf die Aktivitätsabnahme der gluconeogenetischen Schlüsselenzyme und die Hemmung der hepatischen Gluconeogenese durch Praseodym hatte eine Vorbehandlung mit α-HCH keinen Einfluß.

F Literaturverzeichnis

Arvela, P., Kärki, N.T.: The effect of phenobarbital pretreatment on the cerium induced impairment of drug metabolism in rat. Acta pharmakol. et toxicol. 31, 380-386 (1972).

Baginski, E.S., Foa, P.P., Zak, B.: In: Methoden der enzymatischen Analyse, 2. Aufl., S. 839-843. Hrsg. H.U. Bergmeyer. Weinheim: Verlag Chemie (1970).

Bamann, E., Fischler, F., Trapmann, H., Eberhardt, K.H.: Über die Biologische Wirkung der Salze Seltener Erdmetalle, vornehmlich des Lanthans und des Cers, bei intravenöser Zufuhr. Klin. Wschr. 32, 588-590 (1954 a).

Bamann, E., Fischler, F., Trapmann, H.: Verhalten und Spezifität von Cer, Lanthan, Eisen und Aluminium als Phosphatasenmodelle gegenüber physiologisch wichtigen Phosphorsäureverbindungen wie Zuckerphosphorsäure, Adenylsäuren, Adenosintriphosphorsäure und anderen. Biochem. Z. 325, 413-428 (1954 b).

Beisenherz, G., Boltze, H.J., Bücher, Th., Czok, R., Garbade, K.H., Meyer-Arendt, E., Pfleiderer, G.: Diphosphofructose-Aldolase, Phosphoglyceraldehyd-Dehydrogenase, Milchsäure-Dehydrogenase, Glycerophosphat-Dehydrogenase und Pyruvat-Kinase aus Kaninchenmuskulatur in einem Arbeitsgang. Z. Naturforsch. 8b, 555-577 (1953).

Böttger, J., Wieland, O., Brdiczka, D., Pette, D.: Intracellular localization of pyruvate carboxylase and phosphoenolpyruvate carboxykinase in rat liver. Europ. J. Biochem. 8, 113-119 (1969).

Brade, W., Herken, H., Merker H.J.: Regeneration of renal tubular cells after lesion by temporary ischemia, folic acid, and 2,4,5-triamino-6-styryl-pyrimidine. Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmak. 266, 95-100 (1970).

Bruce, D.W., Hietbrink, B.E., DuBois, K.P.: The acute mammalian toxicity of rare earth nitrates and oxides. Toxicol. app. Pharmacol. 5, 750-758 (1963).

Bücher, Th., Luh, W., Pette, D.: Einfache und zusammengesetzte optische Tests mit Pyridinnukleotiden. In: Hoppe-Seyler-Thierfelder, Handbuch der physiologisch- und pathologisch-chemischen Analyse, 10. Aufl., Bd VI/A, S. 292-339. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1964.

Caspersson, T., Hammarsten, E., Hammarsten, H.: Interactions of protein and nucleic acid. Transact. Farady Soc. 31, 367-389 (1935).

Czok, R., Lamprecht, W.: In: Methoden der enzymatischen Analyse, 2. Aufl., S. 1407-1411. Hrsg. H.U. Bergmeyer, Weinheim: Verlag Chemie 1970.

Dagley, S.: In: Methoden der enzymatischen Analyse, 2. Aufl., S. 1520-1523. Hrsg. H.U. Bergmeyer, Weinehim: Verlag Chemie 1970.

Davidson, J.N., Waymouth, C.: Tissue nucleic acids. Biochem. J. 38, 39-50 (1944).

Feigelson, E.B., Pfaff, W.W., Karmen, A., Steinberg, D.: The role of plasma free fatty acids in development of fatty liver. J. clin. Invest. 40, 2171-2179 (1961).

Fischler, F., Roeckl, K.W.: Über Experimentelle Beeinflussung der Leberfunktionen und der anatomischen Leberstruktur durch Einwirkung Seltener Erden. Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Path. Pharmak. 189, 4-21 (1938).

Gaitonde, M.K., Richter, D.: Changes with age in the utilisation of glucose carbon in liver and brain. J. Neurochem. 13, 1309-1318 (1966).

Garland, P.D., Newsholme, E.A., Randle, P.J.: Effect of fatty acids, ketone bodies, diabetes and starvation on pyruvat metabolism in rat heart and diaphragm muscle. Nature 195, 381-386 (1962).

Grajewski, O.: Inauguraldissertation an der Freien Universität Berlin, in Vorbereitung.

Hammarsten, E., Teorell, T.: Versuche über mikrochemische Reaktionen. II. Ausfällungen von Eiweiß-Nukleinsäuren mit Lanthan- und Sulfosalicylsäureionen. Acta med. scand. 68, 226-238 (1928).

Herken, H., Voss, P., Brade, W., Kolbe, H.: Induction of glucose-6-phosphate dehydrogenase and 6-phosphogluconate dehydrogenase in the regenerating kidney after lesions by drugs. Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmak. 267, 297-306 (1970).

Henning, H.V., Seubert, W.: Zum Mechanismus der Gluconeogenese und ihrer Steuerung. I. Quantitative Bestimmung der Pyruvat-Carboxylase in Rohextrakten der Rattenleber. Biochem. Z. 340, 160-170 (1964).

Henning, H.V., Stumpf, B., Ohly, B., Seubert, W.: On the mechanism of gluconeogenesis and its regulation. III. The gluconeogenetic capacity and the activities of pyruvate-carboxylase and PEP-carboxylase of rat kidney and rat liver after cortisol treatment and starvation. Biochem. Z. 344, 274-288 (1966).

Hochstrate, C., Oberdisse, E.: Biochemische Veränderungen im Serum der Ratte nach kombinierter Applikation lebervergrößernder und lebertoxischer Pharmaka. Naunyn-Schmiedergs Arch. Pharmak. 266, 357-358 (1970).

Holten, V.Z., Kyker, G.C., Pulliam, M.: Effects of lanthanide chlorides on selected enzymes. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 123, 913-919 (1966).

Kety, S.S.: General metabolism of the brain in vivo. In: Metabolism of the nervous system, pp. 221-236. Ed. D. Richter, New York: Pergamon Press 1957.

Kunz, W., Schnieders, B.: RNA metabolism and induction of extramicrosomal enzymes during liver enlargement due to drugs. Proceedings of the IVth Int. Congr. on Pharmacol. Basel 1969. Vol. IV, pp. 326-339. Basel-Stuttgart: Schwabe & Co. 1970.

Kyker, C.G., Cress, E.A.: Acute toxicity of yttrium, lanthanum, and other rare earth. A.M.A. Arch. industr. health 16, 475-479 (1957).

Laszlo, D., Ekstein, D.M., Lewin, R., Stern, K.G.: Biological studies on stable and radioactive rare earth compounds. I. On the distribution of lanthanum in the mammalian organism. J. nat. Cancer Inst. 13, 559-573 (1952).

Löffler, G., Wieland, O.: Eine Isotopenmethode zur enzymatischen Bestimmung von Oxalacetat. Biochem. Z. 336, 447-454 (1963).

Lombardi, B., Recknagel, R.O.: Interference with secretion of triglycerides by the liver as a common factor in toxic liver injury. Am. J. Path. 40, 571-586 (1962).

Magnusson, G.: The behavior of certain lanthanons in rats. Acta pharmacol. et toxicol. (Kbh.) 3, Supp. 3, 1-95 (1963).

Maxwell, L.C., Bischoff, F.: The effect of thorium, cerium, erbium, yttrium, didymium, praseodymium, manganese, and lead upon transplantable rat tumors. J. Pharmacol. Exp. Ther. 43, 61-70 (1931).

Mela, C.: Inhibition and activation of calcium transport in mitochondria. Effect of lanthanides and local anesthetic drugs. Biochem. 8, 2481-2486 (1969).

Miledi, R.: Lanthanum ions abolish the "calcium response" of nerve terminals. Nature (Lond.) 229, 410-411 (1971).

Neubert, D., Hoffmeister, I.:Intracelluläre Lokalisation von Fettsubstanzen bei experimenteller Leberverfettung. Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Path. Pharmak. 237, 519-537 (1960).

Nordlie, R.C., Lardy, H.A.: Mammalian liver phosphoenol-pyruvate carboxykinase activities. J. biol. Chem. 238, 2259-2263 (1963).

Novello, F., Stirpe, F.: The effects of copper and other ions on the ribonucleic acid polymerase activity of isolated rat liver nuclei. Biochem. J. 111, 115-119 (1969).

Oberdisse, E.: Biochemische Untersuchungen zum Mechanismus des durch Pharmaka induzierten Leberwachstums. In: Enzyme und Pharmaka, S. 51-62, Hrsg. G.W. Löhr, K.U. Blum, O.J. Wiedemann. Editiones Roche 1970 (a).

Oberdisse, E.: Einfluß von Pharmaka auf die Aktivität normaler und induzierter Fermente der Rattenleber. Habilitationsschrift, Med.Fak. Freie Univ. Berlin 1970 (b).

Oberdisse, E., Schurig, R.: Induktion von Enzymen der Pyrimidin-Biosynthese in der regenerierenden Niere nach Gabe hoher Dosen Folsäure. In: Regeneration der Niere, VIII. Symposion der Gesellschaft für Nephrologie, S. 731-737, Aachen 1971.

Oberdisse, E., Röhling, G., Losert, W., Schurig, R., Oberdisse, U.: Influence of rare earth on insulin secretion in rats. Naunyn-Schmiedergs Arch. Pharmacol. 280, 217-221 (1973 a).

Oberdisse, E., Winkler, R., Köhler, E., Schurig, R., Stolpmann, H.J.: Influence of rare earth on RNA and protein synthesis. 14. Frühjahrstagung der Deutsch. Pharmak. Gesellsch. Mainz 1973. Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmak. Supp. to Vol. 277, R 51 (1973 b).

Passonneau, J.V., Lowry, O.H.: The role of phosphofructokinase in metabolic regulation. In: Advances in Enzyme Regulation, Vol. 2, pp 265-274. Ed. G. Weber, Oxford-London-NewYork-Paris: Pergamon Press 1964.

Recknagel, R.O., Lombardi, B., Schotz, M.C.: A new insight into pathogenesis of carbon tetrachloride fat infiltration. Proc. Soc. Exper. Biol. Med. 104, 608-610 (1960).

Reich, E.,Goldberg, I.H.: Actinomycin and nucleic acid function. In: Pregress in Nucleic Acid Research nach Molecular Biology, Vol. 3, pp. 183-234. Ed. J.N. Davidson and W.E. Cohn. New York-London: Academic Press 1964.

Reich, E.: Actinomycin: Correlation of structure anf function of its complexes with purines and DNA. Science 143, 684-689 (1964).

Röhling, G.: Inauguraldissertation an der Freien Univ. Berlin, in Vorbereitung.

Roobol, A., Alleyne, G.A.O.: A study of stabilization of gluconeogenetic activity in rat liver slices by calcium and manganese ions. Biochem. J. 129, 231-239 (1972).

Seubert, W., Huth, W.: On the mechanism of gluconeogenesis nad its regulation. II. The mechanism of gluconeogenesis from pyruvate and fumarate. Biochem. Z. 343, 176-191 (1965).

Seubert, W.: Stoffwechsel der Kohlenhydrate: Die Gluconeogenese. In: Handbuch des Diabetes mellitus Bd. I, S. 315-343. Hrsg. E.F. Pfeiffer. München: J.F. Lehmanns Verlag 1969.

Schlicht, I., Koransky, W., Magour, S., Schulte-Hermann, R.: Größe und DNS-Synthese der Leber unter dem Einfluß körperfremder Stoffe. Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmak. exp. Path. 261, 26-41 (1968).

Schmautz, E.: Geschlechtsabhängigkeit der Verteilung von Radiocer bei der Ratte. Strahlenther. 123, 267-278 (1964).

Snyder, F., Gress, E.A., Kyker, G.C.: Liver lipid response to intravenous rare earth in rats. J. Lipid. Res. 1, 125-131 (1959).

Snyder, F., Stephens, N.: Plasma free fatty acids and the rare earth fatty liver. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. (N.Y.) 106, 202-204 (1961).

Söling, H.D., Willms, B., Kleineke, J.: Regulation of gluconeogenesis in rat and guinea pig liver. In: Regulation of gluconeogenesis, pp. 210-225, Ed. H.D. Söling and B. Willms. New York-London: (Georg Thieme Verlag) Academic Press 1971.

Steidle, H.: Seltene Erdemetalle. In: Handbuch der experimentellen Pharmakologie, Bd. III, Teil 4, S. 2189-2213. Hrsg. W. Heubner. Berlin: Springer Verlag 1935.

Störmer, B., Jansen, W., Reinauer, H., Staib, W., Hollmann, S.: Enzymaktivitäten und Substratkonzentrationen in der Rattenleber unter den Bedingungen der Cortisol-Gluconeogenese. Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem. 351, 296-304 (1970).

Threlfall, G., Taylor, M.: Modification of the folic acid-induced changes in renal nucleic acid and protein synthesis by actinomycin D and cycloheximide. Europ. J. Biochem. 8, 591-596 (1969).

Tyrell, J.B., Anderson, J.W.: Glycolytic and pentose phosphate pathway enzymes in jejunal umcosa, adaptive responses to alloxan-diabetes and fasting in the rat. Endocrinology 89, 1178-1185 (1971).

Underwood, A.H., Newsholme, E.A.: Properties of phosphofructokinase from rat liver and their relation to the control of glycolysis and gluconeogenesis. Biochem. J. 95, 868-875 (1965).

Utter, M.F., Keech, D.B.: Pyruvate-carboxylase. I. Nature of the reaction. J. Biol. Chem. 238, 2603-2608 (1963).

Vincke, E., Oelkers, H.A.: Zur Pharmakologie der Seltenen Erden. III. Mitteilung: Toxicität und Wirkung auf Stoffwechselvorgänge. Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Path. Pharmak. 188, 465-473 (1938).

Weber, G., Cantero, A.: Glucose-6-phosphate utilization in hepatoma, regenerating and newborn rat liver, and in the liver of fed and fasted normal rats. Cancer Res. 17, 995-1005 (1957).

Weber, G.: Study and Evaluation of regulation of enzyme activity and synthesis in mammalian liver. In: Advances in enzyme regulation, Vol. I, pp. 1-35. Ed. G. Weber. Oxford-London-New York-Paris: Pergamon Press 1963.

Weber, G., Singhal, R.L., Stamm, N.B., Srivastava, S.K.: Hormonal induction and suppression of liver enzyme biosynthesis. Fed. Proc. 24, 745-754 (1965).

Weber, G., Singhal, R.L., Stamm, N.B., Lea, M.A. Fisher, E.A.: Synchronous behavior pattern of key glycolytic enzymes: glucokinase, phosphofructokinase, and pyruvatekinase. In: Advances in enzyme regulation, Vol. IV, pp. 59-81. Ed. G. Weber. Oxford-London-New York-Paris: Pergamon Press (1966).

Weber, G.: Regulation of pyruvatekinase. In: Advances in enzyme regulation, Vol. VII, pp. 15-40. Ed. G. Weber. Oxford-London-New York-Paris: Pergamon Press (1968).

Weiss, G.B., Goodmann, F.: Effects of lanthanum on contraction, calcium distribution, and Ca-45 movements in intestinal smooth muscle. J. Pharm. exp. Ther. 169, 46-55 (1969).

Weiss, G., Ohly, B., Brod, H., Seubert, W.: On the intracellular location of pyruvate carboxylase. In: Regulation of gluconeogenesis, pp. 29-49. Eds. H.D. Söling and B. Willms. Stuttgart: G. Thieme, New York -London: Academic Press 1971.

Wieland, O., Suyter, M.: Glycerokinase: Isolierung und Eigenschaften des Enzyms. Biochem. Z. 329, 320-331 (1957).

Widnell, C.C., Tata, J.R.: Studies on the stimulation by ammonium sulfate of the DNA-dependent RNA polymerase of isolated rat-liver nuclei. Biochim. biophys. Acta (Amst.) 123, 478-492 (1966).

Herrn Prof. Herken danke ich besonders für die kritischen Hinweise und wertvollen Anregungen zur vorliegenden Arbeit sowie für die großzügige Unterstützung während meiner Tätigkeit als Assistent am Pharmakologischen Institut.

Lebenslauf

Am 19. Januar 1944 wurde ich, Randolf Schurig, als dritter Sohn des Landgerichtsrates Walter Schurig in Arnsdorf bei Dresden geboren. In Dresden wuchs ich auf. 1954 siedelte ich nach West-Berlin über. Seit 1956 besuchte ich den altsprachlichen Zweig des Erich-Hoepner-Gymnasiums in Berlin-Charlottenburg und legte an dieser Schule 1963 die Reifeprüfung ab. Anschließend studierte ich an der Freien Universität Berlin Medizin. 1965 bestand ich das Physikum und 1969 das medizinische Staatsexamen. Auch die Medizinalassistentenzeit verbrachte ich in Berlin, davon 9 Monate an der Medizinischen Klinik im Klinikum Westend und 4 Monate auf der Chirurgischen Abteilung des DRK-Krankenhauses Jungfernheide. Im Juli 1970 erhielt ich die Approbation als Arzt. 1965 heiratete ich meine Ehefrau Monika, geborene Zötzl, die ebenfalls als Assistenzärztin in Berlin tätig ist. 1966 wurde unser erster Sohn Richard und 1967 unser zweiter Sohn Sandro geboren.

Nach Erhalt der Approbation arbeitete ich bis November 1972 als wissenschaftlicher Assistent am Pharmakologischen Institut der Freien Universität Berlin. Während dieser Zeit wurden neben anderer Tätigkeit auch die experimentellen Arbeiten für die vorliegende Dissertation durchgeführt. Seit dem 1. 12. 1972 bin ich als Assistent an der Medizinischen Klinik im Klinkum Westend der Freien Universität tätig.